

学 位 論 文

植物ウイルス感染による全身壊死の
分子機構に関する研究

平成 18 年 12 月 博士（生命科学）申請

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

小松 健

目次

1. 序論	
1.1. 感受性と抵抗性：植物とウイルスの相互作用	1
1.2. ウイルス感受性植物における病徴発現の機構	1
1.3. ウイルス抵抗性植物における過敏感反応 (HR) の機構	3
1.4. ウイルス感染による全身壊死	8
1.5. オオバコモザイクウイルス (PIAMV)	9
2. PIAMV 感染による全身壊死反応の解析	13
2.1. 材料と方法	14
2.1.1 オオバコモザイクウイルス (PIAMV) と検定植物および 接種試験	14
2.1.2 TUNEL 法による核 DNA 断片化の検出	16
2.1.3 HR の指標の検出	17
2.1.4 防御関連遺伝子の発現解析	20
2.2. 結果	
2.2.1 全身壊死の解析系の確立：アグロインフィルトレーション法	27
2.2.2 TUNEL 法による核 DNA 断片化の検出	29
2.2.3 HR の指標の検出	29
2.2.4 防御関連遺伝子の発現解析	33
2.3. 考察	
2.3.1 全身壊死の解析系	37
2.3.2 PIAMV 感染による全身壊死には HR が関わる	38
3. PIAMV 感染による全身壊死誘導メカニズムの解析	41
3.1. 材料と方法	
3.1.1 オオバコモザイクウイルス (PIAMV) と検定植物および 接種試験	42
3.1.2 TRV ベクターを用いた宿主因子のノックダウン解析	42
3.1.3 SGT1・RAR1 ノックダウン植物への PIAMV の接種	48
3.2. 結果	
3.2.1 SGT1・RAR1 のノックダウン解析	49

3.2.2	SGT1・RAR1 の PIAMV 感染に伴う全身壊死への影響	51
3.2.3	SGT1・RAR1 の PIAMV 蓄積量への影響	53
3.3.	考察	
3.3.1	PIAMV 感染による壊死には HR 誘導カスケードが関わる	55
3.3.2	HR 誘導カスケードのノックダウンによるウイルス蓄積量の増加	56
4.	PIAMV による壊死のエリシターの解析	59
4.1.	材料と方法	
4.1.1	各種 PIAMV 変異ウイルスの構築	60
4.1.2	RdRp の大量発現、精製、抗体作製	63
4.1.3	<i>N. benthamiana</i> のペレット画分および可溶性画分の調製	68
4.1.4	ウエスタンブロットティング	69
4.1.5	Co-infiltration 解析と RdRp の RNA の検出	70
4.2.	結果	
4.2.1	TGBp1-3,CP の壊死誘導能	73
4.2.2	PIAMV-RdRp の検出系の構築	77
4.2.3	RdRp の壊死誘導能	79
4.3.	考察	
4.3.1	p19 の壊死誘導能への影響	86
4.3.2	TGBp1-3,CP は壊死のエリシターではない	88
4.3.3	感染植物内における RdRp の発現解析	89
4.3.4	RdRp は壊死のエリシターである	89
4.3.5	UTR の有無と複製の壊死誘導能への影響	90
5.	総合考察	
5.1.	全身壊死反応には HR が関わる	93
5.2.	全身壊死には既知の HR 誘導カスケードが関わる	94
5.3.	全身壊死の分子機構に関する考察	95
	摘要	97
	引用文献	103
	謝辞	112

略語一覧

- 3' UTR: 3' untranslated region (3'非翻訳領域)
5' UTR: 5' untranslated region (5'非翻訳領域)
CMV: *Cucumber mosaic virus* (キュウリモザイクウイルス)
CP: coat protein (外被タンパク質)
HR: hypersensitive response (過敏感反応)
MP: movement protein (移行タンパク質)
PCD: programmed cell death (プログラム細胞死)
PIAMV: *Plantago asiatica mosaic virus* (オオバコモザイクウイルス)
PVX: *Potato virus X* (ジャガイモXウイルス)
RdRp: RNA-dependent RNA polymerase ((RNA 依存性 RNA) 複製酵素)
TGBp: triple gene block proteins (トリプルジーンブロックタンパク質)
TMV: *Tobacco mosaic virus* (タバコモザイクウイルス)
TRV: *Tobacco rattle virus* (タバコ茎えそウイルス)
TUNEL: TdT-mediated dUTP nick end labeling
VIGS: virus-induced gene silencing (ウイルス誘導ジーンサイレンシング)

1. 序論

1.1. 感受性と抵抗性：植物とウイルスの相互作用

植物ウイルスにより、作物の品質および生産量は著しく低下する。その被害は全作物生産量の約 10 パーセントにも達するといわれているが、局所的にはより深刻な被害を与えている場合もあると考えられる。ウイルスは植物細胞内において植物の代謝系を利用して寄生することから、農薬などによる化学的防除が不可能である。そのため、植物ウイルスの防除は主に、抵抗性品種の開発や媒介昆虫の駆除、弱毒ウイルスの利用などに頼らざるを得ない状況であり、しかもその効果は極めて限定的である。

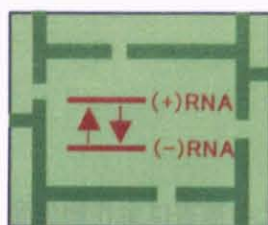
植物ウイルスの感染が成立・発病し被害を受ける植物は「感受性 (susceptibility)」と呼ばれるのに対し、感染が成立せず発病しない植物は「抵抗性 (resistance)」と呼ばれる。ウイルスに対して作物が感受性の場合にはウイルスの感染により大きな被害が及ぼされ生産量が低下するが、作物が抵抗性の場合にはウイルスによる生産量への影響は最小限に抑えられる。このことから、ウイルスに対して作物が「感受性」であるか「抵抗性」であるかという区分は農業生産上きわめて重要である。実際、農業上重要なさまざまな作物において、抵抗性品種の選抜ならびに、抵抗性の形質を従来品種へと導入することによる抵抗性作物品種の開発が、積極的に試みられてきた (Valleau, 1946; Schoelz *et al.*, 2006)。

このように感受性と抵抗性の植物の間には農業生産上大きな違いがあるが、農学研究においても両者は明確に区別されている。すなわち、感受性植物における多様な病徴の発現メカニズムに関する研究と、抵抗性植物におけるウイルスの感染が成立しないメカニズムに関する研究は、互いに全く異なる現象を解析していると考えられてきた。これまでは主に農業生産上の重要性から、後者の植物の抵抗性メカニズムについて、多くの遺伝学的・分子生物学的な解析がおこなわれてきた (Soosaar *et al.*, 2005; Jones and Dangl, 2006)。

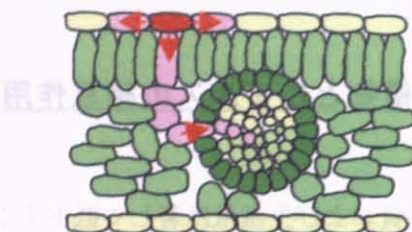
次節以降では、ウイルスに対する感受性植物と抵抗性植物における研究についてそれぞれを詳説する。

1.2. ウイルス感受性植物における病徴発現の機構

植物ウイルスの多くはプラス一本鎖RNA (mRNAと同じ極性のRNAをプラス鎖RNA、その



複製



細胞間移行



長距離移行

図 1-1. 植物ウイルスの感染過程。左から、複製、細胞間移行、長距離移行のモデル図を示す。赤い矢印は植物ウイルスの移行経路を示す。

相補鎖RNAをマイナス鎖RNAと呼ぶ) をゲノムとしてもち、そのゲノムには多くの場合、少なくとも3つのウイルスタンパク質がコードされている。すなわち、ゲノムの複製を担う複製酵素 (RNA-dependent RNA polymerase; RdRp)、細胞間移行に関与する移行タンパク質 (movement protein; MP)、そしてゲノムRNAを被いウイルス粒子を構成する外被タンパク質 (coat protein; CP) である。ウイルスが宿主植物細胞に侵入すると、CPがゲノムRNAから解離し、露出したゲノムRNAをmRNAとしてRdRpなどのウイルスタンパク質が翻訳され、それに引き続いてゲノムの複製が起こる。複製は、RdRpがゲノムであるプラス鎖RNAを鋳型としてマイナス鎖RNAを合成し、このマイナス鎖RNAがプラス鎖RNA合成の鋳型となるという順序で行われる。複製されたウイルスゲノムはMPの働きにより原形質連絡と呼ばれる細胞間を繋ぐ構造を通過し、隣接細胞へと移行する。この過程は細胞間移行と呼ばれ、ウイルスは細胞間移行と複製を繰り返すことで周囲の細胞へと広がる。さらにウイルスは篩管流に乗って長距離移行を行い上葉へと移行する (図1-1)。植物ウイルスの宿主域、粒子の形態、ゲノム核酸の種類、ゲノム構造などは多様であるが、複製と細胞間移行、および長距離移行という3つの過程を経て植物の全身に感染する点は多くのウイルスに共通であると考えられている (Hull, 2002)。

感受性植物においては、上記の過程を通してウイルスは感染を成立させることができる。ウイルスは植物に感染すると様々な病徴を引き起こし、農作物、果樹、園芸植物など多くの有用植物に被害を及ぼす。植物ウイルスの引き起こす外部病徴は、ウイルスの種類によって葉、茎、根、花、果実、種子など植物体の様々な組織に現れる。葉の病徴を例に取っても、

壊死 (necrosis)、モザイク (mosaic)、黄化 (yellows)、輪紋 (ring spot)、縮葉 (rugose) など多様である。この他に、ウイルスが全身感染しているにも関わらず外部病徴が現れないこともあり、これを無病徴感染と呼ぶ。こうした、ウイルスによって引き起こされる外部病徴は宿主植物との組み合わせにより決まる。しかし、同じウイルス種でもその系統により、また同じ宿主植物種でもその品種により示される病徴はしばしば異なる。また、ウイルスの感染が進行するとともに、異なる病徴が連続して示される場合もある。

これまで一般に、ウイルス感染により引き起こされる病徴は、組織内に蓄積するウイルス核酸や種々のウイルスタンパク質により、宿主細胞の正常な代謝活動が攪乱された結果であると推測されてきた (Hull, 2002)。一方、近年、植物は RNA サイレンシングという外来 RNA に対する防御機構を備えており、ウイルス核酸の分解により植物ウイルスの感染を抑制する働きがあることが明らかになりつつある。これに対してウイルスは植物の防御機構を回避する機構を備えている (Voinnet, 2005)。このことから、ウイルス感染に伴い発現する病徴が、ウイルスと植物のせめぎ合いの結果により生じる可能性も示唆されている (Maule *et al.*, 2002; 鍵和田, 2004)。実際、葉の緑色に濃淡が生じるモザイク病徴は、植物の RNA サイレンシングによるウイルスへの防御機構と、この機構を回避しようとするウイルスとの間のせめぎ合いにより生じていることが示されている (Moore *et al.*, 2001)。しかしながら、ウイルス感染とそれに伴う植物の応答は複雑であるため、病徴発現メカニズムの解析は容易ではなく、その詳細について示した例は少ない。そのため、感受性植物におけるウイルスの病徴発現機構に関する知見は、極めて限られている。

1.3. ウイルス抵抗性植物における過敏反応 (HR) の機構

植物は外部からの病原体の侵入に対抗する機構として、動物において発達している獲得免疫系を持たないが、個々の細胞が示す自然免疫系 (innate immunity) を備えている (Jones and Dangl, 2006)。この自然免疫系による植物の抵抗性は「水平抵抗性」と「垂直抵抗性」の二つに分類されている。水平抵抗性は病原体の系統や作物品種に限定されない抵抗性である。対して、垂直抵抗性は特定の病原体の系統と作物品種間に誘導される系統-品種特異的な抵抗性である。このうち、有用作物にウイルス抵抗性を付与するのによく利用されてきたのは、環境条件によって変動しにくく極めて強い抵抗性を示す垂直抵抗性である。垂直抵抗性は多くの場合、宿主品種の単一の抵抗性遺伝子が決定しているため、多数の遺伝子により決

定される水平抵抗性に比べて、作物育種を行う際に非常に扱いやすいという性質を持つ。以後、本論文においては簡略化のために「垂直抵抗性」のことを「抵抗性」と呼ぶこととする。

この「抵抗性」のなかで最も研究が進んでいるのが、局所的な細胞死を伴う抵抗性反応である「過敏感反応 (hypersensitive response; HR)」と呼ばれる機構である。HR は、 H_2O_2 の蓄積、カロースの蓄積、イオンリーク量の増大、*PR-1a*、*hsr203j*、*HIN1* などの防御関連遺伝子の発現誘導といった反応を伴い、これらは植物における HR の指標とされる (Pontier *et al.*, 1998; Pasqualini *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2004; Seo *et al.*, 2006)。また HR は、細胞における核 DNA の断片化を伴っており、動物細胞におけるアポトーシスと類似したプログラム細胞死 (programmed cell death; PCD) であると考えられている。実際、動物細胞のアポトーシス抑制因子である Bcl-xL や、バキュロウイルスのカスパーゼインヒビターでありアポトーシスを抑制する p35 タンパク質は、ともに植物における HR も抑制することができる (Mitsuhara *et al.*, 1999; del Pozo and Lam, 2003)。これらの結果は、HR が PCD であり、アポトーシスと類似した現象であることを示唆している。このことから、動物におけるアポトーシスと同様に、植物における PCD である HR は、初期感染細胞の積極的な細胞死により外部から侵入してきたウイルスなどの寄生的な病原体を封じ込め、植物に抵抗性を付与していると考えられる (Greenberg and Yao, 2004)。

HR は単一の抵抗性遺伝子により決定される系統・品種特異的な抵抗性反応であり、その機構は、Flor により提唱された遺伝子対遺伝子説 (gene-for-gene theory) により説明される (Flor, 1956)。これによると、植物が特定の病原体の系統に対して HR を示すのは、病原体が非病原性遺伝子 (avirulence gene; Avr gene) を持ち、それに対応する抵抗性遺伝子 (resistance gene; R gene) を植物が持つ場合である。すなわち、HR を示すウイルス抵抗性植物においては、ウイルスの非病原性遺伝子産物 (細胞死を誘導することから「エリシター」と呼ばれる) と植物の抵抗性遺伝子産物 (「R タンパク質」と呼ばれる) が、直接的 (Dodds *et al.*, 2006) あるいは間接的 (Mackey *et al.*, 2003) に相互作用することにより HR が誘導されていると考えられる。

多くの R タンパク質には特徴的な NBS-LRR 型のドメイン構造が保存されている。すなわち、中央領域に NBS (nucleotide-binding site) ドメイン、C 末端側に LRR (leucine-rich repeat) ドメインがあり、N 末端には TIR (toll and interleukin-1 receptor protein) ドメインあるいは CC (coiled-coil) ドメインをもつ (Dangl and Jones, 2001) (図 1-2)。R タンパク質はこのうち、LRR ドメインを介して病原体のエリシターと相互作用し、HR を誘導する (DeYoung

and Innes, 2006)。植物はこのような特徴的な NBS-LRR 型のドメイン構造を持つ R タンパク質を多数そのゲノムにコードしており、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) には約 150 個 (Meyers *et al.*, 2003)、イネ (*Oryza sativa*) には 500 個弱存在する (Yang *et al.*, 2006)。この R タンパク質の NBS-LRR 型の構造は、動物の自然免疫系に関わるタンパク質ファミリーにおいても認められ、機能上および進化上の関連に興味を持たれる (Jones and Takemoto, 2004)。

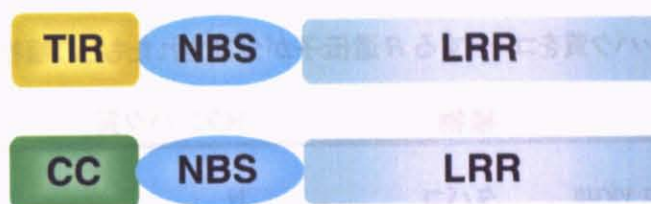


図1-2. Rタンパク質に特徴的なNBS-LRR型のドメイン構造。N末端のドメインが異なる2つのタイプが存在する。上がTIR-NBS-LRR型、下がCC-NBS-LRR型。

このような、R タンパク質とエリシターの相互作用により誘導される HR に関しては多くの研究がなされており、例えば、タバコモザイクウイルス (*Tobacco mosaic virus*; TMV) に対して N 遺伝子をもつタバコが示す HR はその一つである。この場合、タバコの N 遺伝子産物 (N タンパク質) が R タンパク質として、TMV の RdRp がエリシターとして同定されており、両者の相互作用により HR が誘導される。この HR により TMV は初期感染細胞に封じ込められ、全身感染できない。他にも、遺伝学的な解析やアグロインフィルトレーション法による一過的発現系 (2章参照) による解析により、HR を誘導する R タンパク質とエリシターの組み合わせが、さまざまな植物と病原体との相互作用において同定されている。そのうちウイルスが関与する代表的な例について表に示した (Bendahmane *et al.*, 1995; Teraporewala and Culver, 1997; Mestre *et al.*, 2000) (表 1-1)。

しかし、植物がゲノム中にコードする R タンパク質は、自然界に存在する無数の植物病原体の全てを特異的に認識するだけの数はない。また、R タンパク質の詳細な研究のほとんど

は、TMV とタバコをはじめとして表 1-1 に示したものに代表されるような、長きにわたり研究されてきた植物—病原体の相互作用に限られてきた。そのため、大部分の R タンパク質については、それぞれがいかなる病原体に対する HR の誘導に関与しているかは未解明である。

表 1-1. これまでに同定された、HR を引き起こす R タンパク質とエリシターの組み合わせの例。植物は、R タンパク質をコードする R 遺伝子が分離されたもとの植物を示した。

ウイルス	植物	Rタンパク質	エリシター
<i>Tobacco mosaic virus</i>	タバコ	N	RdRp
<i>Tobacco mosaic virus</i>	タバコ	N´	CP
<i>Potato virus X</i>	ジャガイモ	Rx	CP
<i>Potato virus Y</i>	ジャガイモ	Ry	CP
<i>Tomato mosaic virus</i>	トマト	Tm-2 ²	MP
<i>Turnip crinkle virus</i>	シロイヌナズナ	HRT	CP

これまで、ウイルス誘導遺伝サイレンシング (virus-induced gene silencing; VIGS) 法 (Lu *et al.*, 2003b) による遺伝子のノックダウン解析や遺伝学的な解析により、上に述べた HR に必須な宿主因子が数多く報告されている。なかでも SGT1、RAR1 は分子シャペロンである HSP90 のコシャペロンとして機能することにより、多数の R タンパク質の安定化に関与しており、多くの HR に共通して重要な因子である (Austin *et al.*, 2002; Peart *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2003a; Bieri *et al.*, 2004)。さらにエリシターを認識し活性化した R タンパク質の下流では MAP キナーゼ (mitogen-activated protein kinase; MAPK) カスケードが活性化される。このカスケードは前述の TMV と N 遺伝子の組み合わせにより起こる HR においてよく研究されており、MAPK である WIPK (wounding-induced protein kinase) や SIPK

(salicylic acid-induced protein kinase) のほか、MAPK を活性化する MAPKK (MAPK kinase)、さらに MAPKK を活性化する MAPKKK (MAPKK kinase) が存在し、これらはいずれも HR に重要な役割を果たしていると考えられている (Nakagami *et al.*, 2005)。また MAP キナーゼカスケードの下流では多数の転写因子の発現が誘導され、PR (pathogenesis-related) タンパク質などの発現が上昇した結果、HR が引き起こされると考えられている (Kim and Zhang, 2004) (図 1-3)。

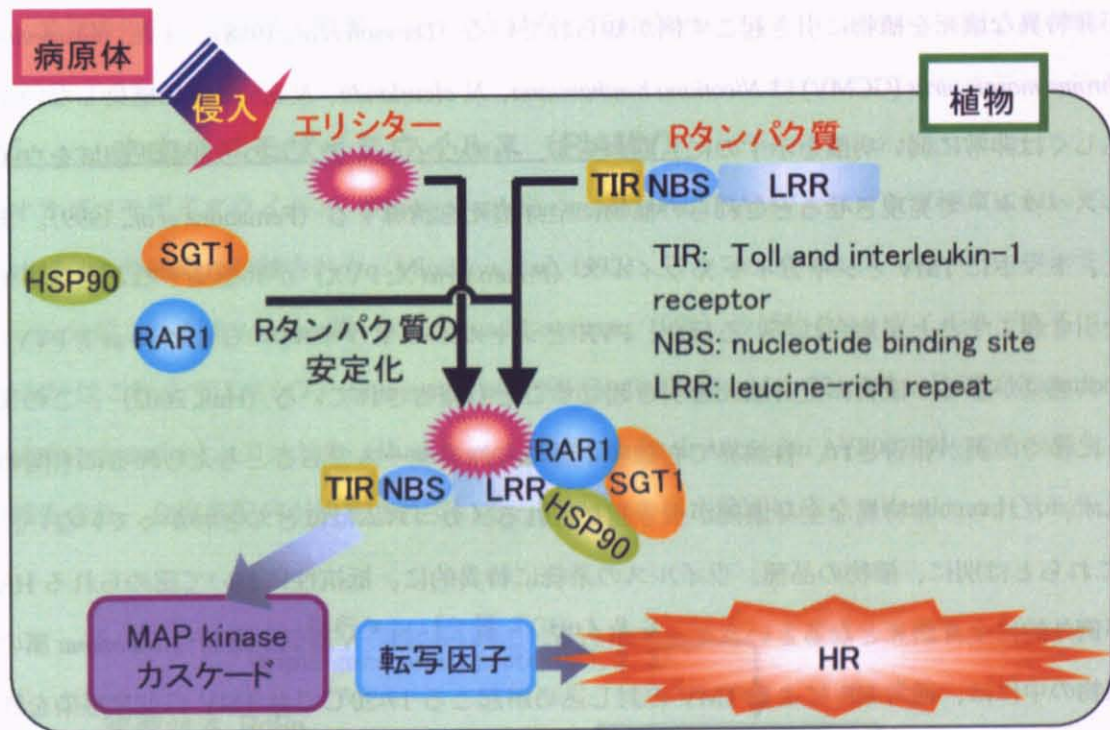


図 1-3. R タンパク質依存的な HR 誘導カスケードの模式図。R タンパク質は代表として TIR-NBS-LRR 型のものを示している。

1.4. ウイルス感染による全身壊死

全身壊死 (systemic necrosis) は、ウイルスが感受性の植物に引き起こす病徴のうち、最も激しく作物への被害が大きいものの一つである。他の病徴の発現機構と同様、全身壊死についてもその発現機構の研究は限られているが、植物ウイルスによる全身壊死には大きく二つのケースがあるとされる (Hull, 2002)。一つは、異種ウイルスの共感染や変異ウイルスの感染により非特異的に激しい全身壊死が引き起こされるケースであり、もう一つは、前節で詳説した R タンパク質とエリシターにより誘導される HR が、宿主やウイルスの遺伝型や環境条件の変化などにより例外的に全植物体に広がり全身壊死を呈するケースである (Hull, 2002)。

前者の非特異な全身壊死と考えられるケースでは、例えば、TMV の CP の部分欠失変異体が非特異な壊死を植物に引き起こす例が知られている (Dawson *et al.*, 1988)。また、*Grapevine chrome mosaic virus* (GCMV) は *Nicotiana benthamiana*、*N. clevelandii*、*N. tabacum* に感染しないかもしくは非常に弱い病徴を示すのにも関わらず、そのウイルスゲノムの 5'非翻訳領域をウイルスベクターで発現させるとこれらの植物に全身壊死を誘導する (Fernandez *et al.*, 1999)。また、トマトに TMV とジャガイモ X ウイルス (*Potato virus X*; PVX) が共感染すると全身壊死を引き起こすことが知られているほか、PVX とジャガイモ Y ウイルス (*Potato virus Y*; PVY) の共感染が多くの植物に全身壊死を引き起こすことも報告されている (Hull, 2002)。このように多くの例が報告され、自然界でも数多く認められるケースであると考えられるにも関わらず、これらの非特異な全身壊死が引き起こされるメカニズムはほとんどわかっていない。

これらとは別に、植物の品種、ウイルスの系統に特異的に、抵抗性において認められる HR が例外的に全身壊死となるというケースがある。これらには、*N* 遺伝子を持つ *Nicotiana* 属の植物の中には、通常 HR による TMV の封じ込めが起こる 17-20°C でも TMV の全身感染を許してしまい全身壊死が起こる植物種があるという報告 (Dijkstra *et al.*, 1977) や、*N* 遺伝子を持つタバコでも植物体が非常に小さい段階では頻度が低いものの TMV が全身感染し全身壊死が起こるとの報告 (Dijkstra *et al.*, 1977)、さらに、TMV の 1 アミノ酸の変異により *N* 遺伝子による HR が打破され、これにより TMV が局部に封じ込められず全身感染し全身壊死が生ずるとの報告などがある (Culver and Dawson, 1989)。また、トマトモザイクウイルス (*Tomato mosaic virus*; ToMV) に対する抵抗性遺伝子 *Tm-2* と *Tm-2²* を持つトマトは通常、それぞれ対応する系統の ToMV に対し HR を示すが、トマトの遺伝型や環境条件 (特に温度) によっては

2-3 週間で全身壊死を示すことが報告されている。実際、*Tm-2²*を持つトマトは通常 ToMV-2²株に HR による抵抗性を示すが、トマトの品種 GCR267 は *Tm-2²*を持つにも関わらず例外的に ToMV-2²株が感染すると全身壊死を示す (Weber *et al.*, 1993)。また、キュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus*; CMV) の Fny 系統に対してササゲが引き起こす HR においては、CMV の RNA2 にコードされる 2a タンパク質がエリシターとして機能しているが、2a タンパク質の 631 と 641 番目のアミノ酸を変化させるとウイルスは全身感染し葉に退緑症状を示すのに対して、631 番目のアミノ酸のみを変化させると全身壊死が示されるという報告がある (Kim and Palukaitis, 1997)。

これらの報告は全て、従来より研究されているウイルス抵抗性植物における HR が、例外的に全身壊死となる例である。これらの場合、何らかの理由で HR が打破されウイルスが初期感染部位に封じ込められずに全身に移行し、全身壊死に至るものと推測されている。しかし、全身壊死に至る詳細な機構は明らかとはなっていない。

1.5. オオバコモザイクウイルス (PIAMV)

オオバコモザイクウイルス (*Plantago asiatica mosaic virus*; PIAMV) はロシア極東においてオオバコより初めて単離された (Minskaya *et al.*, 1977)、アルファウイルス・スーパーファミリに分類される *Potexvirus* 属 (Koenig and Lesemann, 1978) の植物 RNA ウイルスである。PIAMV はこれまでにロシア (Solovyev *et al.*, 1994; GenBank Accession Z21647)、日本 (Komatsu *et al.*, in preparation)、アメリカ (Hughes *et al.*, 2005; GenBank Accession AY800279) でその発生が報告され、全塩基配列が決定されている。PIAMV の宿主範囲は広く (Kostin and Volkov,

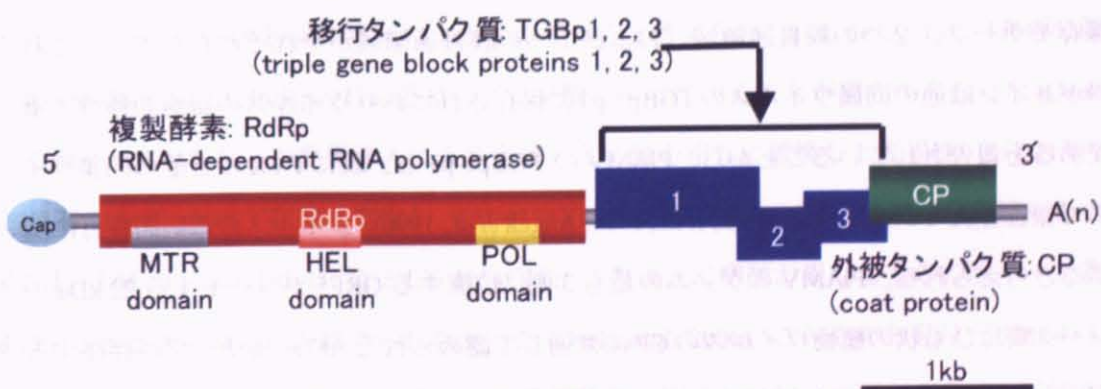


図1-4. *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV)のゲノム構造

1976)、自然界において双子葉植物 (オオバコ、ロシア分離株)、単子葉植物 (ユリ、日本分離株)、木本植物 (ナンテン、アメリカ分離株) への感染が報告されている。PIAMV のウイルス粒子は、幅約 11 nm、長さ約 500 nm のひも状である。そのゲノムは全長約 6.1 kb のプラス一本鎖 RNA であり、5'末端には他の同属ウイルスと同様にキャップ構造が付加されていると考えられ(Sonenberg *et al.*, 1978)、また 3'末端には poly(A) tail が付加している (Morozov *et al.*, 1983)。PIAMV のゲノム RNA には、5 つの ORF と 5'非翻訳領域 (5'UTR)、3'非翻訳領域 (3'UTR)が存在する (図 1-4)。5 つの ORF (ORF1-5) は 5'側から順に 156 kDa, 25 kDa, 12 kDa, 13 kDa, 22 kDa のタンパク質をそれぞれコードしている。ORF1 がコードする 156 kDa のタンパク質には、*Potexvirus* 属ウイルスの RdRp に共通するメチルトランスフェラーゼ (MTR) ドメイン、ヘリカーゼ (HEL) ドメイン、ポリメラーゼ (POL) ドメインが見いだされ(Forster *et al.*, 1988; Huisman *et al.*, 1988)、ヘリカーゼドメインにおいては NTP 結合活性に必要な GKS モチーフ(Davenport and Baulcombe, 1997)、ポリメラーゼドメインにおいてはポリメラーゼ活性に必要な GDD モチーフ(Longstaff *et al.*, 1993)といった複製に重要なモチーフがそれぞれ保存されている。このことから、PIAMV の ORF1 には、PVX などの他の *Potexvirus* 属のウイルスと同様、複製に関与する RdRp がコードされていると考えられる。ORF1 の 3'側に位置しそれぞれ一部がオーバーラップする ORF2, 3, 4 はトリプルジーンブロック (triple gene block; TGB) と呼ばれる特徴的なゲノム構造をとっている。この遺伝子群にコードされるタンパク質はトリプルジーンブロックタンパク質 (triple gene block proteins; TGBp) と呼ばれ、*Potexvirus* 属ウイルス以外に *Furovirus* 属ウイルス、*Hordeivirus* 属ウイルスなどのゲノムにもコードされている (Morozov and Solovyev, 2003)。PIAMV の TGB がコードする 25 kDa, 12 kDa, 13 kDa のタンパク質 (それぞれ TGBp1, TGBp2, TGBp3 と呼ばれる) には、ヘリカーゼの保存モチーフ、2 つの膜貫通領域、および 1 つの膜貫通領域がそれぞれ存在する。これらのドメインは他の同属ウイルスの TGBp1-p3 に保存されておりウイルスの細胞間移行に重要であると報告されていることから、PIAMV の TGBp1-p3 も、既に PVX など他の同属ウイルスで報告されているように(Beck, *et al.*, 1991; Angell *et al.*, 1996)、ウイルスの細胞間移行に関与すると考えられる。PIAMV のゲノムの最も 3'側に位置する ORF5 がコードする 22 kDa のタンパク質はひも状の植物ウイルスの CP に共通して認められる AFDF モチーフが存在することから PIAMV の CP であり(Morozov *et al.*, 1983)、ゲノム RNA の粒子化と細胞間移行に関与すると考えられる(Chapman *et al.*, 1992; Santa Cruz *et al.*, 1996)。また、*Potexvirus* 属ウイルスの 5'UTR は RdRp の翻訳 (Smirnyagina *et al.*, 1991; Pooggin and Skryabin, 1992; Zelenina *et al.*, 1992;

Kim and Hemenway, 1996)、ならびに複製 (Miller *et al.*, 1998; Kim and Hemenway, 1996) に重要であることが報告されている。また 3'UTR も複製に重要であることが示されている (Guilford *et al.*, 1991; Cheng and Tsai, 1999; Pillai-Nair *et al.*, 2003)。PIAMV のウイルス分離株間でも極めて相同性が高い PIAMV の非翻訳領域には、*Potexvirus* 属ウイルスの非翻訳領域において上記の機能に重要であると報告される配列が保存されている。以上から、PIAMV の両 UTR も、RdRp の翻訳や複製に重要であると考えられる。

PIAMVは我が国においては、2002年に青森県のコオニユリ (*Lilium maximowiczii*) より単離されたユリ分離株 (Li1-Li6) (山下ら, 2003) のゲノム塩基配列が当研究室で決定されている (Komatsu *et al.*, in preparation)。PIAMVは他にも北海道において発生が報告されている (竹内、佐々木, 2003) ほか、PIAMVと近縁のウイルスである *Tulip virus X* (TVX) もユリへの発生が我が国で報告されており (Yamaji *et al.*, 2001)、花卉植物の栽培における当該ウイルスおよびその近縁ウイルスに対する防除の重要性は非常に高い。

PIAMVについては、これまでタバコ属の検定植物である *Nicotiana benthamiana* における全身壊死が研究されている。ユリを原宿主とするPIAMVは、感受性植物である *N. benthamiana* に全身感染することができ、HRにより局部的に封じ込められる分離株は存在しない。しかし当宿主に示される病徴は分離株ごとに異なる。Li1分離株は全身壊死を引き起こすが、Li1分離株と全塩基配列で99%以上の高い相同性を示すLi6分離株は全身感染するものの無病徴である。Li1による全身壊死は、壊死が肉眼で見え始める時期の上葉においてLi1分離株のゲノムRNAが検出されることから、ウイルスの全身感染により引き起こされていると考えられた (Ozeki *et al.*, 2006)。

当初、*N. benthamiana* に引き起こされるLi1分離株による全身壊死は、1.4.で論じた2種類の全身壊死のケースのうち非特異な壊死によるものであると考えられた。しかし、Li1、Li6両分離株による病徴の違いは、RdRpの1154番目のアミノ酸によっていることが明らかになった (Ozeki *et al.*, 2006)。すなわち、点変異導入により当該アミノ酸を相互に置換した変異株 (Li1-1154YおよびLi6-1154C) が示す病徴は変化し、Li1-1154Yは無病徴であり、Li6-1154Cは全身壊死を引き起こす (図1-5)。またLi1-1154YとLi6-1154Cは、このように病徴が異なるもののウイルス蓄積量および移行能には違いが認められなかった (Ozeki *et al.*, 2006)。これらの知見は、RdRpの1アミノ酸の変異により、PIAMVと、なんらかの植物側の因子との相互作用が変化した結果病徴が変化した可能性を示唆している。これらのことから、PIAMVと *N. benthamiana* との未解明の相互作用の実態に興味を持たれた。

植物体の全身壊死はその被害の深刻さにも関わらず、誘導に関わるウイルスおよび植物因子に関する研究は少なく、そのメカニズムの分子レベルでの解明には程遠いのが現状である。本研究では、PIAMV による全身壊死が HR によるものであることを示すとともに、典型的な HR 誘導カスケードに必要な宿主因子が全身壊死誘導にも関与していることを明らかにした。さらに、PIAMV による壊死を誘導するウイルス因子（エリシター）についても解析し、全身壊死の分子機構の全容の解明を試みた。

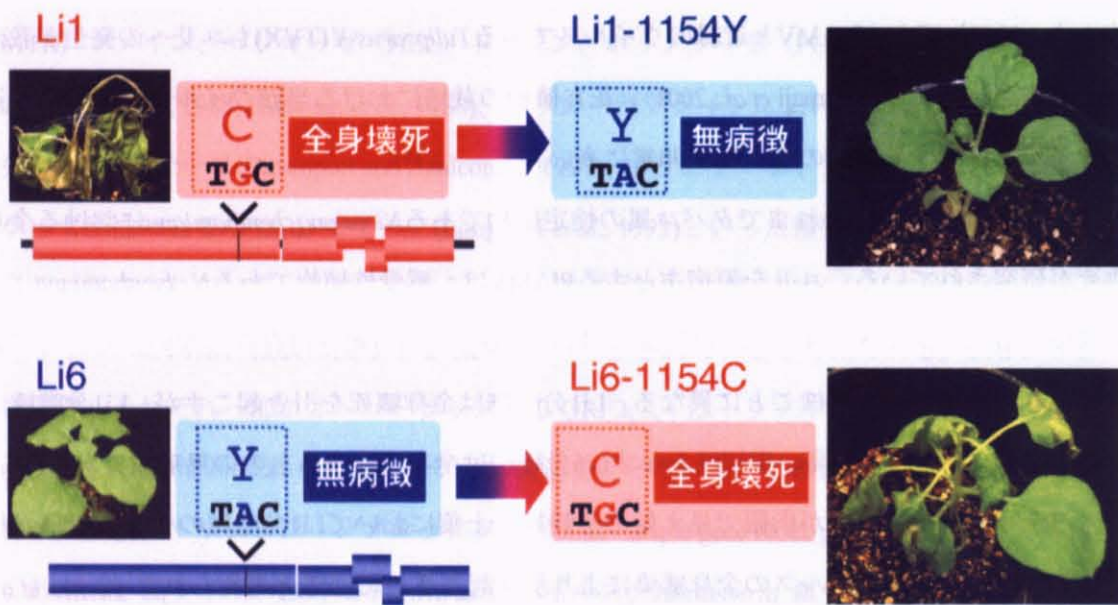


図 1-5. PIAMV の Li1、Li6 分離株の病徴決定因子と、当該アミノ酸に点変異を導入した変異株の病徴

2. PIAMV 感染による全身壊死反応の解析

我が国において発生が報告された PIAMV は、ユリなどの花卉植物において壊死などの激しい病徴を示し、甚大な被害を及ぼす (山下ら, 2003)。PIAMV に関しては、そのウイルスゲノム塩基配列の決定、ならびにタバコ属の検定植物である *N. benthamiana* を用いた病原性に関する分子遺伝学的研究が既に行われている。*N. benthamiana* に全身壊死を引き起こす PIAMV の Li1 分離株の同宿主に無病徴全身感染する Li6 分離株との病徴の違いは、ウイルスの複製酵素の 1 アミノ酸によっていることが既に報告されている (Ozeki *et al.*, 2006)。全身壊死は、PIAMV - *N. benthamiana* という実験系のみならず自然界でも広く観察され、作物の収量を著しく低下させる農業生産上非常に重要な病徴である。しかし、全身壊死反応の詳細に関する研究は非常に少なく、全身壊死のメカニズムはほとんどわかっていない。

本章では PIAMV による壊死を一様かつ同調的に引き起こし、簡便で再現性のよい解析をすることを目的として、その接種にアグロインフィルトレーション法を用いる系を確立した。これにより、PIAMV 感染による *N. benthamiana* の全身壊死反応において、プログラム細胞死 (programmed cell death; PCD) に伴う DNA の断片化、さらには H_2O_2 の生成やカロースの蓄積、防御関連遺伝子の発現誘導が認められるかを解析した。本章の結果により、感受性植物 (ウイルスが全身に感染する) に引き起こされる全身壊死には、抵抗性植物 (ウイルスが局部的に封じ込められる) に観察される過敏感反応 (hypersensitive response; HR) が関わっていることが強く示唆された。

2.1. 材料と方法

2.1.1 オオバコモザイクウイルス (PIAMV) と検定植物および接種試験

本研究で用いたオオバコモザイクウイルスの日本系統である PIAMV-Li1 および Li6 分離株は 2002 年に青森県のモザイク症状を呈するコオニユリから見いだされたもので、山下一夫氏より分譲していただいた (山下ら, 2003)。Li1、Li6 は検定植物である *N. benthamiana* に全身壊死 (Li1) と無病徴 (Li6) を示す。Li1、Li6 分離株は、本研究室において既に、その病徴を再現する感染性バイナリーベクターが構築されており、それぞれ pLi1、pLi6 と名付けられている (Ozeki *et al.*, 2006)。

pLi1 および pLi6 は、それぞれ Li1、Li6 分離株のウイルスゲノム RNA から逆転写した全長ウイルス cDNA をアグロバクテリウムのバイナリーベクター pCAMBIA1301 にクローニングした。つまり、全長ウイルス cDNA は、カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターとノパリン合成酵素遺伝子のターミネーターである NOS ターミネーターとの間に挿入してあり、アグロバクテリウムによる植物での一過的発現が引き起こされる。この感染性バイナリーベクター pLi1 および pLi6 は、それぞれを形質転換したアグロバクテリウムを *N. benthamiana* に注入する (アグロインフィルトレーション) と、それぞれ Li1、Li6 の病徴を再現する (Ozeki *et al.*, 2006)。また、Li1 (壊死) と Li6 (無病徴) の病徴決定因子である複製酵素の 1154 番目のアミノ酸を相互に置換した変異ウイルスである Li1-1154Y (無病徴) と Li6-1154C (壊死) についても既にバイナリーベクターにクローニングされている (Ozeki *et al.*, 2006)。本研究ではこれらのバイナリーベクターを用いて PIAMV 感染による全身壊死に伴う PCD の解析を行った。

N. benthamiana は、全身病徴に関する解析には播種後約 4 週間の植物体を使用し、アグロインフィルトレーション法による接種領域の解析には播種後約 6 週間の植物体を用いた。接種はアグロインフィルトレーション法により、各 PIAMV 感染性バイナリーベクターを形質転換したアグロバクテリウムを植物に注入することによりおこなった。アグロバクテリウムの形質転換および、アグロインフィルトレーション法の具体的な方法は以下に示した。

アグロバクテリウムの形質転換

感染性バイナリーベクターのアグロバクテリウムへの形質転換は、freeze-thaw 法によりおこなった (An *et al.*, 1988)。具体的な方法は、以下の通りである。

1. PIAMV の感染性バイナリーベクターの DNA (約 200 ng) を 1.5 ml サンプルチューブに分注し、50 μ l の *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 コンピテントセル (作成方法は下記参照) と混合した。
2. 液体窒素中で 1 分間冷やして凍らせ、その後 SOC 培地 (SOB 液体培地に 20 mM glucose を加えた溶液; SOB 液体培地 1000 ml あたりの組成は Bacto-tryptone 20 g、Yeast extract 5 g、NaCl 0.5 g、終濃度 2.5 mM KCl、終濃度 10 mM $MgCl_2$) を 1 ml 加え 28°C で 3 時間培養した。
3. 形質転換されたアグロバクテリウムを、LB (1000 ml あたりの組成 : Bacto-tryptone 10 g、Yeast extract 5 g、NaCl 10 g、Agarose 15 g) / kanamycin (終濃度 50 μ g/ml) プレート培地に塗布して 28°C で 2 晩静置。

EHA105 コンピテントセルは以下の手順で作製した。

1. 前培養としてグリセロールを含む培地中で -80°C で保存されている EHA105 菌株を LB 液体培地 2 ml で 28°C、一晩振盪培養した。
2. 培養液 0.5 ml を 100 ml の LB 液体培地に植え次いだ。
3. $OD_{600} = 0.5$ 前後まで 28°C で振盪培養した。
4. 氷水で 10 分以上静置して急冷した。
5. 3,000 \times g、4°C で 5 分間遠心して集菌した。
6. 上清を廃棄後、氷上で沈殿に 10 ml の 20 mM $CaCl_2$ 溶液を加えて穏やかに懸濁した。
7. 3,000 \times g、4°C で 5 分間遠心して集菌した。
8. 上清を廃棄し、20 mM $CaCl_2$ 溶液を 1 ml 加えて再懸濁した。
9. 適当な量 (100-400 μ l) ずつエッペンドルフチューブに分注し液体窒素で瞬間凍結させ、-80°C で保存した。

アグロインフィルトレーション法

1. LB プレート培地に生えたコロニーを LB 液体培地 (Bacto-tryptone 10 g、Yeast extract 5 g、NaCl 10 g/1000 ml) /kanamycin に移し、28°C で 1-2 晩、培地が適度に濁るまで振盪培養した。
2. 3,000×g、4°C で 15 分間遠心して集菌した。
3. 上清を廃棄し、インフィルトレーションバッファー (10 mM MgCl₂、10 mM MES、150 μM acetosyringone / pH 5.7) に OD₆₀₀=1.0 となるように懸濁した。
4. 室温、遮光下で 3 時間静置した。
5. 十分に灌水した *N. benthamiana* の展開葉の背軸側に、1 ml のシリンジを用いてアグロバクテリウムの懸濁液を注入した。

2.1.2 TUNEL 法による核 DNA 断片化の検出

核 DNA の断片化はプログラム細胞死 (programmed cell death; PCD) の初期に観察される特徴で、ヌクレオソーム間の DNA リンカー領域で切断が起こる。この DNA 断片化には二本鎖の切断および一本鎖の切断 (ニック) があるが、いずれの切断においてもフリーの 3'-OH 末端が生じる。その 3'-OH 末端は標識ヌクレオチド (ビオチン-dUTP、DIG-dUTP やフルオレセイン-dUTP) を使用した酵素反応によって標識し検出することが可能である。この標識ヌクレオチドを付加する酵素反応には、Terminal deoxytransferase (TdT) が用いられ dNTP のポリメライゼーションを触媒する。この方法は TUNEL (TdT-mediated dUTP-X nick end labeling; X=biotin, DIG, fluorescein など) 法と呼ばれ、高感度かつ迅速な PCD 検出法として知られている。

本研究では *In situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche) を用いて、PIAMV 感染による壊死に PCD が伴っているかを解析した。具体的な方法は、以下の通りである。

1. 感染性バイナリーベクターあるいはバイナリベクターを保持するアグロバクテリウムの接種領域の葉片を、4 %PFA 溶液 (100 ml 中 : 10×PBS バッファー {PBS バッファー (120 mM NaCl、7 mM Na₂HPO₄、3 mM NaH₂PO₄、2.7 mM KCl) } 10 ml、1 N NaOH 80 μl、4 % (w/v) paraformaldehyde) 中で 4°C で一晩固定した。
2. 段階的にエタノールおよび 2-methyl-2-propanol で脱水した。
3. Paraplast Plus (Sherwood Medical) で包埋した。

4. 包埋した試料をマイクロトームで葉面に水平な方向で厚さ 10 μm に切り、スライドガラス (Fisher Scientific) にアプライした。
5. キシレンでパラフィンを取り去った。
6. 段階的にエタノールで再水和した。
7. 純水で 1 分間の洗浄を 2 回繰り返した後、PBS バッファーで 2 回、それぞれ 10 分間、5 分間洗浄した。
8. 組織切片を Proteinase K 処理し、ポジティブコントロールとして用いる試料については DNase I 処理を行った。Proteinase K 処理は、Proteinase K 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む 0.01 M Tris-HCl (pH 7.5) の溶液を用いて、試料を室温で 20 分間インキュベートした。DNase I 処理は、DNase I 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ を含む 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) の溶液を用いて、試料を室温で 20 分間インキュベートした。
9. PBS バッファーで 3 回すすいだ後、TUNEL 反応液を用いて 37°C で 1 時間インキュベートした。その後、TUNEL による反応を停止させるために PBS バッファーで 3 回すすいだ。TUNEL 反応溶液の調整については用いたキットの説明書に従った。
10. 組織切片を共焦点レーザー顕微鏡 PASCAL (Carl Zeiss) にて観察した。

2.1.3 HR の指標の検出

PIAMV による壊死について解析するため、HR 反応に特徴的な複数の指標を解析した。植物間の個体差および葉位による差異を最小限に抑えるために、PIAMV-Li1、Li6、Li1-1154Y、Li6-1154C の各ウイルス株を一枚の葉の約 4 分の 1 ずつにアグロインフィルトレーション法により接種し、6 日後にトリパンブルー、アニリンブルー、DAB (3,3'-diaminobenzidine) の各種溶液で染色した。また、接種 4 日後にイオンリーク量を電気伝導度計を用いて測定した。

トリパンブルー染色

トリパンブルーは死細胞を青く染色する試薬であり、本研究ではトリパンブルー染色法を用いて死細胞を観察した。染色は、既報の方法 (Koch and Slusarenko, 1990) を改変した方法を用いた。具体的な方法は、以下の通りである。

1. ラクトフェノール溶液（フェノール結晶 10 g、滅菌水 10 ml、グリセロール 10 ml、乳酸 10 ml）に 10 mg のトリパンブルーを加えよく溶解させた。
2. 感染性バイナリーベクターを保持するアグロバクテリウムの接種葉を、1 のラクトフェノール-トリパンブルー溶液を 2 倍量の 99%エタノールで薄めた溶液に浸した。
3. ドラフトの中に入れたホットプレートで 2 を熱し、葉が一様に透き通るまで、約 3 分沸騰させた。
4. 一晚静置した。
5. 抱水クロラル溶液(抱水クロラル 1 kg を滅菌水 400 ml に溶解したもの)で葉を洗い、振盪しながら脱色した。
6. LAS-1000 (FUJIFILM) を用いて染色された葉の画像を取得した。

DAB 染色

DAB (3,3'-diaminobenzidine) はペルオキシダーゼの発色基質であり、ペルオキシダーゼと活性酸素の存在下で茶色に発色し、沈着する。そのため、植物細胞における H_2O_2 の検出に用いることができる。本法により H_2O_2 生成の検出を試みた。染色は、既報の方法 (Thordal-Christensen *et al.*, 1997) を改変した方法を用いた。具体的な方法は、以下の通りである。

1. 1 mg/ml の 3,3'-diaminobenzidine (DAB) 溶液に感染性バイナリーベクターを保持するアグロバクテリウムの接種葉を浸した。
2. アスピレーターで吸引し葉に DAB 溶液を浸潤させた。完全にしみ込むよう 2、3 回吸引を反復した。
3. 室温で遮光し 2 時間静置した。
4. 99%エタノール中に葉を入れ、振盪しながら脱色した。色が抜けた後、水に置換した。
5. スキャナーGT-7000ART (EPSON)を用いて染色された葉の画像を取得した。

アニリンブルー染色

アニリンブルーは 1,3-β グルコース残基に結合し、紫外光下で明るい黄色がかった緑色の蛍光を発するカロース検出試薬である (Smith and McCully, 1978)。本研究ではこのアニリンブルー染色によって、カロース沈着の検出を試みた。染色は、既報の方法 (Rate *et al.*, 1999) を改変した方法を用いた。具体的な方法は、以下の通りである。

1. 感染性バイナリーベクターを保持するアグロバクテリウムの接種葉をビーカーの底に置き、アルコールラクトフェノール液 (ラクトフェノール : 99%エタノール = 1 : 2) を葉が浸る程度に入れた。
2. ドラフト中にホットプレートを置き、ホットプレートで 1 のビーカーを熱し、約 3 分沸騰させた。
3. 50%エタノールで葉をすすぎ、徐々に滅菌水を加えてエタノールを水に置換した。
4. 0.05%アニリンブルーを 0.15 M K_2HPO_4 に溶解した溶液に 1 時間、遮光した室温下で浸した。
5. LAS-1000 (FUJIFILM) を用いて、紫外光下の葉における蛍光を検出し画像を取得した。

電気伝導度の測定

電気伝導度の測定によって、植物におけるイオンリーク量を定量した。イオンリーク量は、葉片を滅菌水中で振盪した後、滅菌水中の電気伝導度を測定することで解析できる。測定は、既報の方法 (Lopez-Solanilla *et al.*, 2004) を改変した方法を用いた。具体的な方法は、以下の通りである。

1. 感染性バイナリーベクターを保持するアグロバクテリウムの接種領域から、リーフパンチャーで直径 7 mm の葉片を 2 枚打ち抜いた。
2. 3 ml の滅菌水を入れたチューブに 2 枚の葉片を入れ、30 ml のシリンジと接続しチューブ内の空気を引くことで真空状態を作り、滅菌水を葉片に浸透させた。
3. 室温にて、200 rpm で 3 時間振盪した。
4. チューブ内の水の電気伝導度を電気伝導度計 B-173 (堀場製作所) で測定し、 $\mu S/cm$ という単位で記録した。

2.1.4 防御関連遺伝子の発現解析

プローブ転写用鋳型プラスミドの構築

N. benthamiana の全 RNA を鋳型として、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法によって防御関連遺伝子 (*PR-1a*, *hsr203j*, *HIN1*) を増幅し、それぞれプラスミドベクターのマルチクローニングサイトにクローニングした。市販されているベクターのマルチクローニングサイトの両側には DNA から RNA を転写するための RNA ポリメラーゼのプロモーター配列が付加されているものがある。本研究ではこれらのプロモーター配列から RNA ポリメラーゼを用いて RNA を転写することによって、ジゴキシゲニン (digoxigenin; DIG) をラベルした RNA プローブを作製した。この DIG ラベル RNA プローブを用いて、DIG システム (Roche Diagnostics) によるノーザンブロットによって、防御関連遺伝子の mRNA の検出を試みた。

N. benthamiana からの全 RNA の抽出は、ISOGEN (Nippon Gene) を用いて以下の方法で行った。

1. *N. benthamiana* の葉約 0.1 g に液体窒素を加えて乳鉢、乳棒により磨砕した。
2. ISOGEN 1 ml を加えてさらに磨砕し、溶液をエッペンチューブに移した。
3. 20,000 g で 5 分遠心し、上清を新しいエッペンチューブに回収した。
4. クロロホルムを 200 μ l 加え vortex し、2 分室温で静置後 20,000 g で 5 分遠心した。
5. 4 の上清についてイソプロパノール沈澱を行って、沈澱を RNase free の滅菌水に溶解し RNA サンプルとした。
6. 抽出した RNA の純度および濃度をスペクトロフォトメーターで確認した。

それぞれの防御関連遺伝子を PCR 増幅するために、5'末端特異的プライマー（プライマー名の最後に”F”と付記）と 3'末端特異的プライマー（プライマー名に”R”と付記）をそれぞれの防御関連遺伝子に関して設計した。

PR-1a に対しては 5'-AAG AAT TCG AAC CTT TGA CCT GGG ACG A-3' (*PR1a-150F*) および 5'-TTG AAT TCA AGC TTC GAG TTA CGC CAA ACC ACC T-3' (*PR1a-400R*) を用いた。また、*hsr203j* には 5'-AGG TAC ACA CTA AAC AAA CTT C-3' (*hsr203F*) および 5'-CGT GAC AAT

CAA GAC GGT ACA T -3' (*hsr203R*)、*H1N1* には 5'- CCG AAT TCA TGC CGG AAT CCA ACT TGA A -3' (*H1N1-1F*) および 5' -GGC TCG AGC TAC CAA TCA AAA TGG CAT CT -3' (*H1N1-690R*) を用いた。

RT-PCR 法は RNA LA PCR kit (AMV) ver1.1 (TaKaRa) を用い、添付されたプロトコルに従って以下の方法で行った。

1. *N. benthamiana* の全 RNA を 1 µg 使用し、3'末端特異的プライマーおよび逆転写反作用試薬を加え逆転写反応を 42°C で 25 分行った。
2. 99°C で 5 分間加熱して逆転写酵素を失活させた。
3. 2. の反応液に 5'末端特異的プライマーおよび PCR 用の試薬を加えて PCR 反応を行った。PCR の増幅条件は下に示した。

94°C	3:00	} 35 cycle
94°C	0:30	
55°C	0:30	
72°C	2:00	
72°C	7:00	
4°C	∞	

RT-PCR により増幅された各防御関連遺伝子の DNA はそれぞれ約 250 (*PR-1a*)、1150 (*hsr203j*)、690 (*H1N1*) 塩基であった。これらの RT-PCR 産物はフェノールクロロホルム抽出、クロロホルムイソアミルアルコール抽出、エタノール沈澱により精製したのち、さらにプライマー、dNTP の除去のため Suprec02 (TaKaRa) を用いて精製し、クローニングサンプルとして用いた。

これらのうち、*PR-1a* 増幅断片は以下のような手順で、プラスミドベクター pBlueScript KS+ にクローニングした。

1. Suprec02 で精製した DNA を適当量の TE で希釈した。
2. 増幅断片を *EcoRI* により完全切断するように処理した。
3. 0.7% Agarose Gel で泳動し EtBr 染色後に UV で可視化し、目的のサイズのバンドをゲルより回収し、DNA 断片を UltraClean 15 DNA Purification Kit (MO BIO) を用いて精製した。精製プロトコルは、付属のマニュアルに従った。

4. 同様に pBlueScript KS+ vector も *EcoRI* により切断し、精製した。
5. 精製したインサートとベクターを Ligation-Convenience Kit (ニッポンジーン) を用いて 16°C、5 分間 ligation した。
6. ligation 後のサンプルに 900 μ l の *E. coli* JM109 コンピテントセル (作成方法は下記参照) を氷上で混合し 30 分静置した。
7. 42°C、1 分間熱ショックを与え、数分氷上で静置した後、SOC 培地 (SOB 液体培地に 20 mM glucose を加えた溶液; SOB 液体培地の組成は 2.1.1 節 (p15) 参照) で 37°C、1 時間静置した。
8. 形質転換された大腸菌を、LB (1000 ml あたりの組成: Bacto-tryptone 10 g、Yeast extract 5 g、NaCl 10 g、Agarose 15 g) / ampicillin / IPTG (isopropyl-thio- β -D-galactoside) / X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) プレート培地に塗布して 37°C で 1 晩静置した。プレートは直径 94 mm の丸形プラスチックシャーレを使用し ampicillin は 100 μ g/ml で培地中に予め添加しておいた。
9. 培養後、いくつかのコロニーを選び、LB 液体培地 (Bacto-tryptone 10 g、Yeast extract 5 g、NaCl 10 g / 1000 ml) / ampicillin で 37°C、16 時間振盪培養し、アルカリ SDS 法でプラスミドを精製した。
10. プラスミドを、*EcoRI* で切断し insert のチェックを行った。
11. 目的の断片が挿入されていると思われたクローンをいくつか選抜し、シーケンスにより配列を確認した。シーケンスには、pBlueScript KS+ vector のマルチクローニングサイトの外側にアニールするプライマーである T7 promoter primer (5'- TAA TAC GAC TCA CTA TA -3) および T3 promoter primer (5'- ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA -3) を用いた。シーケンスの方法は後述する。
12. 目的の配列が挿入されていたクローンを選び、プラスミドの大量精製と制限酵素切断、および DIG ラベル RNA プロブの転写に用いた。

E. coli JM109 コンピテントセルは以下の手順で作成した。

1. 前培養としてグリセロールを含む培地中で -80°C で保存されている JM109 菌株を LB 液体培地 2 ml で 37°C、一晩振盪培養した。
2. 培養液 0.5 ml を 50 ml の LB 液体培地に植え次いだ。

3. OD₆₀₀ = 0.4 前後まで 37°C で振盪培養した。
4. 氷水で 30 分以上静置して急冷した。
5. 3,000×g、4°C で 10 分間遠心して集菌した。
6. 上清を廃棄後、氷上で沈殿に 25 ml の 50 mM CaCl₂ 溶液を加えて穏やかに懸濁した。
7. 氷上で 60 分以上静置した。
8. 3,000×g、4°C で 10 分間遠心して集菌した。
9. 上清を廃棄し、50 mM CaCl₂、25% Glycerol 溶液を 2.5 ml 加えて再懸濁した。
10. 適当量 (100-400 μl) ずつチューブに分注し液体窒素で凍結させ、-80°C で保存した。

一方の *hsr203j* および *HINI* 増幅断片は以下のような手順で、プラスミドベクター pGEM-T easy (Promega) にクローニングした。

1. Suprec02 で精製した DNA を 0.7% Agarose Gel で泳動後、EtBr 染色後に UV で可視化し、目的のサイズのバンドをゲルより回収し、DNA 断片を UltraClean 15 DNA Purification Kit (MO BIO) を用いて精製した。精製プロトコールは、付属のマニュアルに従った。
2. 精製したインサートは、pGEM-T Easy ベクター (Promega) と、pGEM-T Easy vector Systems に付属の DNA ligase を用いて付属のマニュアルに従って ligation させた。
3. *PR-1a* の場合と同様に大腸菌 JM109 コンピテントセルを形質転換し、クローンを選抜し配列を確認した。シーケンスには、pGEM-T easy vector のマルチクローニングサイトの外側にアニールする T7 promoter primer および SP6 promoter primer (5'- ATT TAG GTG ACA CTA TAG -3') を用いた。

塩基配列の決定

単離したクローンの塩基配列の決定には ABI PRISM 3130 DNA Sequencer (Applied Biosystems) を用い、Dyedeoxyterminator 法で各プラスミドクローンの塩基配列の解析を行った。シーケンスサンプルの準備は、以下の方法で行った。

1. 以下の組成でリアクションを行った。また、リアクションの条件は右に示した。

PreMix (Applied Biosystems)	1 μ l	96°C	3:00	} 25 cycle
5x Seq buffer (Applied Biosystems)	1.5 μ l	96°C	0:15	
Primer (5 μ M)	0.32 μ l	50°C	0:05	
Template DNA	50-250 ng	60°C	4:00	
DDW	up to 10 μ l	4°C	∞	

2. カラム担体の Sephadex G-50 SuperFine (粉末状) (Applied Biosystems) を適量ウェルに入れた。
3. 300 μ l の DDW を入れ、カラム担体を水和させた。
4. 室温で約 2 時間放置した。
5. 600 \times g、5 min 遠心し、カラムから余計な水分を取り除いた。
6. サンプルをカラムにアプライし、2600 rpm、5 min で遠心した。
7. 溶出された溶液を約 60 分間遠心濃縮機にかけ、サンプルを完全に乾燥させた。
8. 乾燥したサンプルを 15 μ l のホルムアミドで溶解した。
9. Vortex を用いてよく混和した。
10. 95°C、2 min 煮沸し、DNA を 1 本鎖の状態にした。
11. その後すぐに氷水中に入れて急冷させた。
12. サンプルを PRISM 3130 DNA Sequencer (Applied Biosystems) 内にセットし、塩基配列の解読を行った。

塩基配列の解析

塩基配列の解析は GENETYX-MAC Ver. 13.0.11 (GENETYX Corporation) を用いた。

プラスミドの大量精製と制限酵素による切断

防御関連遺伝子が正しくクローニングされたプラスミドは、大腸菌に形質転換したのち大量培養し、NucleoBond PC500 (MACHERY-NAGEL) によりカラム精製を行った。

次いで、シーケンスによって確認されたマルチクローニングサイト内での遺伝子の方向により、以下の制限酵素で切断した。

PR-1a : *Hind*III, hsr203j : *Spe*I, HIN1 : *Nco*I

直鎖化したそれぞれのプラスミドはフェノールクロロホルム抽出、クロロホルムイソアミルアルコール抽出、エタノール沈澱により精製し、RNase フリーの滅菌水に DNA の濃度が 1-2 µg/µl となるように溶解した。

DIG ラベル RNA プローブの転写

DIG ラベル RNA プローブの転写は、*PR-1a* ならびに *hsr203j* については T7 RNA ポリメラーゼを、*HINI* については SP6 RNA ポリメラーゼを用いて、以下の組成で行った。反応は、37°C で 2 時間行った。

直鎖化プラスミド template (1-2 µg/µl)	1 µl
10x T7 RNA polymerase buffer (TaKaRa)	2 µl
10 mM DIG RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics)	2 µl
BSA (TaKaRa)	2 µl
Ribonuclease Inhibitor (TaKaRa)	0.3 µl
50 mM DTT (TaKaRa)	2 µl
RNA polymerase (T7 or SP6) (TaKaRa)	0.5 µl
DDW	up to 20 µl

転写した DIG ラベル RNA プローブはアガロースゲル電気泳動により、それぞれ約 250 (*PR-1a*)、1150 (*hsr203j*)、690 (*HINI*) 塩基の RNA が転写されていることを確認すると同時に濃度を測定し、RNA プローブの濃度を 50 ng/µl に調整し、-80°C に保存した。

ノーザンブロット解析

N. benthamiana からの全 RNA 抽出は、ISOGEN (Nippon Gene) を用いて上に述べた方法で行った。抽出した全 RNA を、RNA 量を測定してアガロースゲルに泳動し、ノーザンブロット解析をおこなった。その具体的な手順は以下の通りである。

1. 全 RNA は 95°C で 5 分間変成処理し、ホルムアルデヒド変成アガロースゲル (1.2%アガロース、1×MOPS、5%ホルムアルデヒド) で電気泳動することによりサイズ分離した。
2. アガロースゲルの RNA を、Turboblotter system (Schleicher & Schuell) によりポジティブチャージナイロンメンブレン (Roche) に転写した。

3. rRNA のバンドを LAS-1000 で撮影した後、メンブレンを 2×SSC 溶液で 10 分間洗った後、
1,200×100 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ 、3 分間の条件で UV を照射し RNA をメンブレンにクロスリンクさせた。
4. ハイブリバッファー (50%脱イオン化ホルムアミド、5×SSC、50 mM Na-phosphate、2% Blocking reagent (Roche)、0.1% N-Lauroylsarcosine、0.2% Yeast tRNA、7% SDS) を用い、ハイブリバック (コスモバイオ) 中でプレハイブリダイゼーションを 68°C で 2 時間行った。
5. プローブをハイブリバッファー 1 ml あたり 100 ng 加え、ハイブリダイゼーション反応を 68°C で一晩行った。
6. メンブレンを洗浄した後、Blocking バッファー (100 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、1% Blocking reagent) で 1 時間以上ブロッキングを行った。
7. Anti-Digoxigenin-Fab-AP 抗体 (Roche) を 1 万倍希釈した Blocking バッファー中で 20 分間抗体反応を行った。
8. 0.3% Tween20 を含む DIG バッファー (100 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl) で 15 分間メンブレンを洗浄した。3 回繰り返した。
9. AP バッファー (100 mM Tris-HCl pH 9.5、100 mM NaCl、50 mM MgCl_2) で 5 分間洗浄した後、CDP-star (New England Biolabs) をメンブレン上で 5 分間反応させ検出を行い、LAS-1000 により撮影した。

2.2. 結果

2.2.1 全身壊死の解析系の確立：アグロインフィルトレーション法

すでに本研究室において、PIAMV-Li1 分離株感染による *N. benthamiana* の全身壊死のウイルス側決定因子は、RdRp の 1154 番目の 1 アミノ酸であることが明らかになっている (Ozeki *et al.*, 2006)。つまり、Li1 の RdRp の 1154 番目のアミノ酸はシステイン (C) であり、壊死しない分離株である Li6 の RdRp の 1154 番目のアミノ酸はチロシン (Y) である。そして Li1 の RdRp の 1154 番目のアミノ酸をチロシンとなるよう変異導入した Li1-1154Y は壊死を示さなくなるのに対して、Li6 の RdRp の同座位のアミノ酸をシステインとした変異体の Li6-1154C は壊死を示す (図 1-5, 12 ページ)。

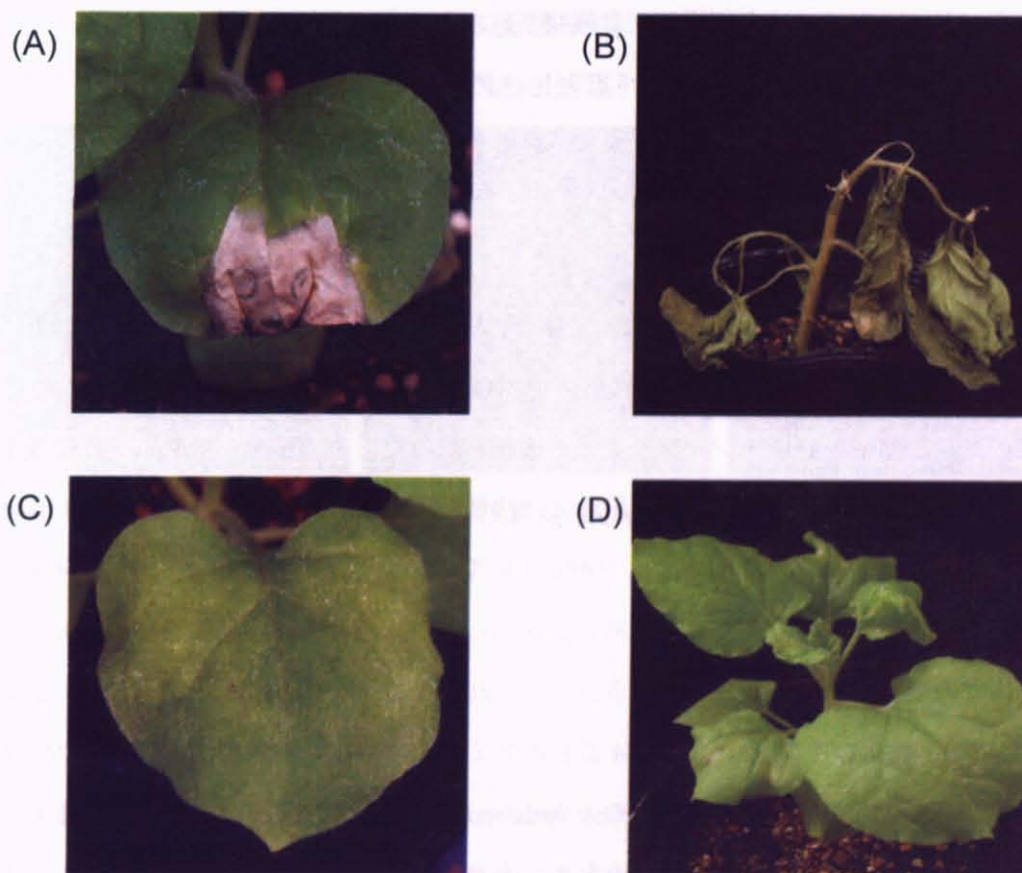


図 2-1. 感染性パイナリーベクターを形質転換したアグロバクテリウムを *N. benthamiana* に注入接種した時の接種葉と植物体の示す病徴。(A)は Li1 を接種した接種葉、(B)は Li1 が感染した植物体、(C)は Li6 を接種した接種葉、(D)は Li6 が感染した植物体。

本研究では PIAMV の全身壊死に伴う反応を詳細に解析するため、これら 4 ウイルス分離株・変異株 (Li1、Li6、Li1-1154Y、Li6-1154C) を発現するバイナリーベクターを形質転換したアグロバクテリウムをアグロインフィルトレーション法により *N. benthamiana* の展開葉に注入することによりそれぞれのウイルスを感染させ、その病徴を比較した。以後、簡略化のため、バイナリーベクターを形質転換したアグロバクテリウムの名称を、バイナリーベクターそのものの名前で表すこととする (ただし、ベクターの名称につける「p」は除いた)。

接種領域においては、接種約 5 日後までに Li1 の壊死が徐々に観察されはじめ、10 日後までには接種領域全体が一様に壊死した (図 2-1(A))。Li6-1154C も Li1 と同様に接種領域全体の一様な壊死が認められたが、その壊死は Li1 に比較して 1 日程度早く観察され、かつ激しかった。また接種 14 日後までには Li1 および Li6-1154C を接種した植物体では全身壊死が観察された (図 2-1(B)) ; Li1 のみ示す。Li6-1154C も同様)。一方、Li6 の接種領域では 2 週間以上観察を継続したが、接種領域においても、全植物体においても壊死は観察されなかった (図 2-1(C,D))。Li1-1154Y も Li6 と同様壊死は観察されなかった。また、アグロインフィルトレーションによる影響を検討するため、バイナリベクターである pCAMBIA1301 (ウイルスの cDNA が組み込まれていないためウイルスの感染を引き起こさない) をアグロインフィルトレーション法により *N. benthamiana* の葉に注入し、2 週間以上観察を継続したが壊死は認められなかった。

また、本研究室で壊死のウイルス側決定因子を RdRp の 1154 番目の 1 アミノ酸であることを決定する際に作製した各種キメラウイルス (Ozeki *et al.*, 2006:Fig.2(B)) についても、同様にアグロインフィルトレーション法による接種を試みた。その結果、RdRp の 1154 番目のアミノ酸が Li1 型のシステインである場合には接種領域の壊死および全植物体の壊死が認められたのに対し、同じ 1154 番目のアミノ酸が Li6 型のチロシンである場合には、接種領域においても全植物体においても壊死は認められなかった。すなわち、接種領域での壊死は常に全植物体での全身壊死と一致して観察された。これらのことから、以後、Li1 (壊死) および Li6 (無病徴)、およびその RdRp の 1154 番目のアミノ酸を置換した変異体 (Li1-1154Y (無病徴) および Li6-1154C (壊死)) を 1 枚の *N. benthamiana* の展開葉にアグロインフィルトレーション接種した接種領域での病徴を対象として、全身壊死の解析を行うこととした。

以降、Li1 および Li6-1154C を「壊死型」の PIAMV、Li6 および Li1-1154Y を「無病徴型」の PIAMV と呼ぶこととする。

2.2.2 TUNEL 法による核 DNA 断片化の検出

壊死型の PIAMV の引き起こす壊死に PCD が伴っているかを調べるため、PCD に特徴的な現象である核 DNA 断片化を TUNEL 法により検出した。

壊死が肉眼では観察されない接種 4 日後に、接種領域から切片を作製した。断片化された DNA をフルオレセインの緑色の蛍光によって検出したところ、無病徴型の Li6 の接種領域では緑色の蛍光は観察されなかった。一方、組織切片を DNase I により処理し、DNA を人為的に断片化したところ、緑色の蛍光が観察された（ポジティブコントロール）。これに対して、壊死型の Li6-1154C の接種領域では DNase I の処理をせずとも緑色の蛍光が認められたことから、PCD の特徴である核 DNA の断片化が起こっていると考えられた（図 2-2）。

このことから、壊死型の PIAMV 感染による壊死に PCD が伴っていることが示唆された。

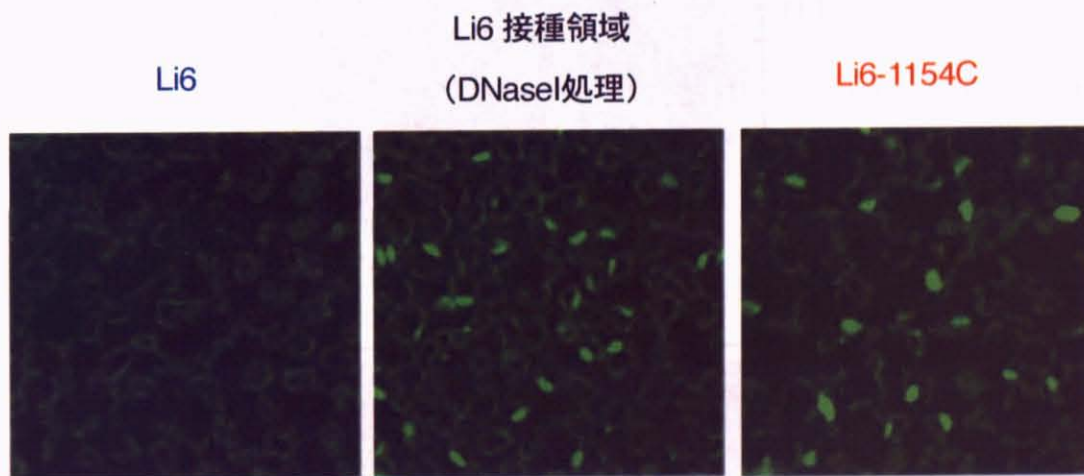


図2-2. TUNEL法による核DNA断片化の検出

2.2.3 HR の指標の検出

次に、壊死型の PIAMV の接種領域が不可逆的な細胞壊死を伴っているかを調べるため、死細胞を選択的に青く染め、可視化することができるトリパンプルー (trypan blue) を用いた染色を用いて、4 種のウイルスをアグロインフィルトレーション接種した葉 (図 2-3) を処理した。その結果、壊死が肉眼ではっきりと観察される接種 6 日後において、壊死型である Li1 および Li6-1154C の接種領域は一様に青色に染色されたが、無病徴型である Li1-1154Y および

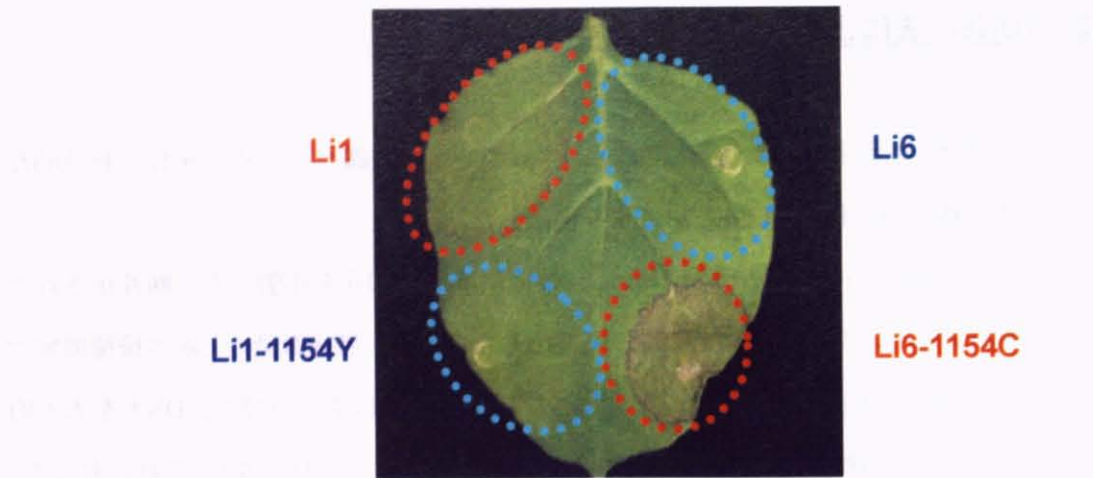


図2-3. 4種のウイルスを1枚の展開葉に接種したときの病徴

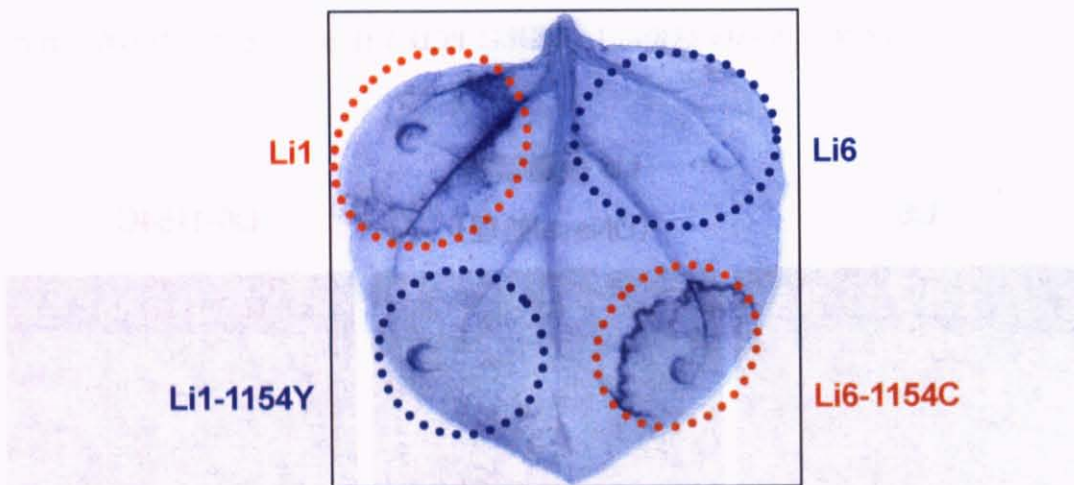


図2-4. トリパンプルー染色による死細胞の可視化

Li6 の接種領域は染色されなかった (図 2-4)。また実体顕微鏡による観察でも壊死型の Li1-1154Y および Li6 の接種領域内には青く染まる細胞はほとんど見いだされなかった。これらから、壊死型の PIAMV の接種領域には不可逆な細胞壊死が引き起こされていることがわかった。

HR においては、局所的な細胞死に先んじて H_2O_2 が生成することが知られている (Epple *et al.*, 2003 ; Ehrenfeld *et al.*, 2005)。そこで、4種のウイルスをアグロインフィルトレーション接種した葉から、DAB (3,3'-diaminobenzidine) 染色法を用いて、 H_2O_2 を茶褐色の染色として検出することを試みた。その結果、接種 6 日後において、壊死型の Li1 および Li6-1154C の接種領域は茶褐色に染色されたが、無病徴型の Li1-1154Y および Li6 の接種領域は染色されなかった (図 2-5)。このことから、壊死型の PIAMV の接種領域では H_2O_2 が生成されることがわかった。

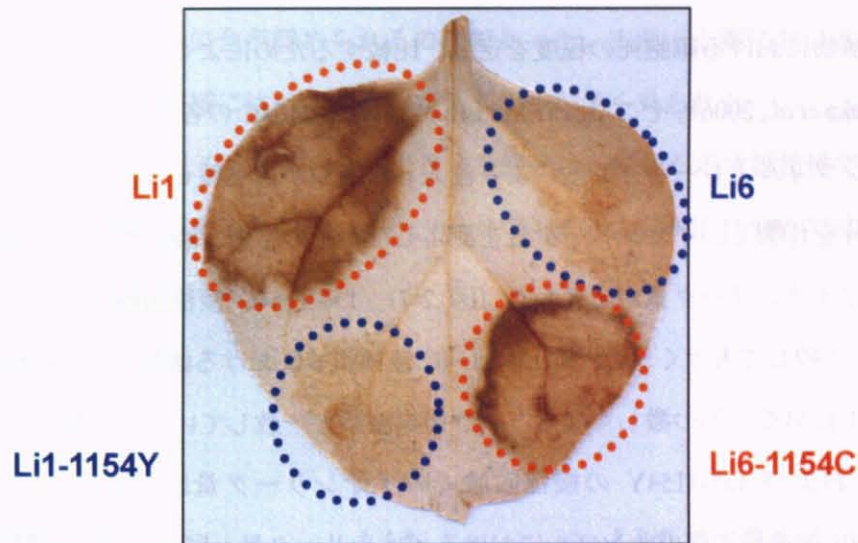


図2-5. DAB染色法によるH₂O₂の検出

また、HR においては、壊死斑の形成とともにカロースが沈着することが知られている (Rate *et al.*, 1999 ; Ehrenfeld *et al.*, 2005)。そこで、4 種のウイルスをアグロインフィルトレーション接種した葉から、アニリンブルー (aniline blue) 染色法を用い、カロースを紫外光下における白色の発光として検出した。その結果、接種 6 日後において、壊死型の Li1 および Li6-1154C の接種領域は紫外光下で一樣に明るい白色の蛍光を発したが、無病微型の Li1-1154Y および Li6 の接種領域では白色の蛍光は認められなかった (図 2-6)。このことから、壊死型の PIAMV の接種領域ではカロースが沈着していることがわかった。

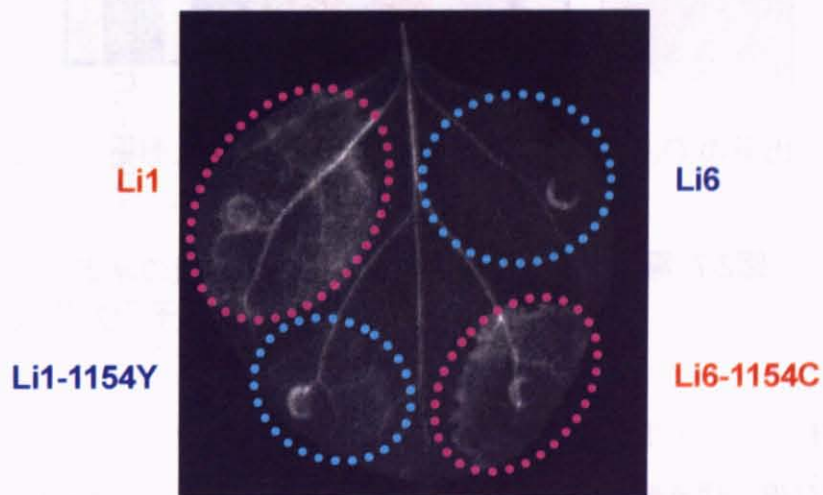


図2-6. アニリンブルー染色法によるカロースの沈着

植物細胞の細胞死においては、イオンリーク量の増大が認められる。電気伝導度計を用いることにより、細胞死の際に漏出してくるイオン (イオンリーク) の量を測定することがで

きるため、植物における細胞死の程度を定量、比較するためによく用いられる (Epple *et al.*, 2003; Kaminaka *et al.*, 2006)。そこで、Li1, Li6, Li1-1154Y, Li6-1154C の各ウイルスを *N. benthamiana* にアグロインフィルトレーション法により注入した領域から接種 6 日後にリーフパンチャーを用いて葉片を作製し、イオンリーク量を測定した。その結果、壊死型の Li1、Li6-1154C の接種領域ではイオンリーク量が増大した (図 2-7)。Li6-1154C 接種領域のイオンリーク量は Li1 のそれに比較して大きく、これは Li6-1154C 接種領域における壊死が Li1 接種領域における壊死より 1 日早く、かつ激しくなるという観察結果と一致していた。これに対して、無病徴型の Li6 および Li1-1154Y の接種領域でのイオンリーク量は、コントロールとした pCAMBIA1301 の接種領域のサンプルにおけるイオンリーク量と同程度であった (図 2-7)。

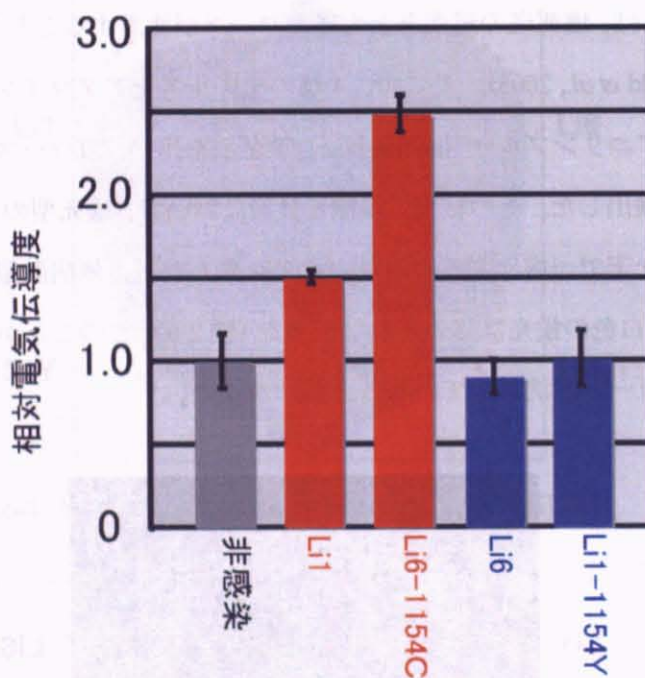


図2-7. 電気伝導度計を用いたイオンリーク量の測定

最後に、以上の HR の指標がアグロインフィルトレーションによる接種領域だけでなく、上葉でも壊死型の PIAMV 特異的に引き起こされているかを確認した。ここでは DAB 染色による H_2O_2 の検出の結果のみを示した (図 2-8)。図のように、壊死型の Li1 では (非接種の) 上葉、茎ともに茶褐色の染色が認められるのに対して、無病徴型の Li1-1154Y では接種して

いない健全植物と同程度の染色が認められるのみであった。また、上葉における HR の指標の検出においては、接種領域に比べ非特異的なシグナルが多く見られた。

以上の実験より、Li1 および Li6-1154C による全身壊死は、植物が示す抵抗性である HR と類似した生化学的特徴を示すことがわかった。一方で Li6 および Li1-1154Y ではこれらの特徴は観察されなかった。

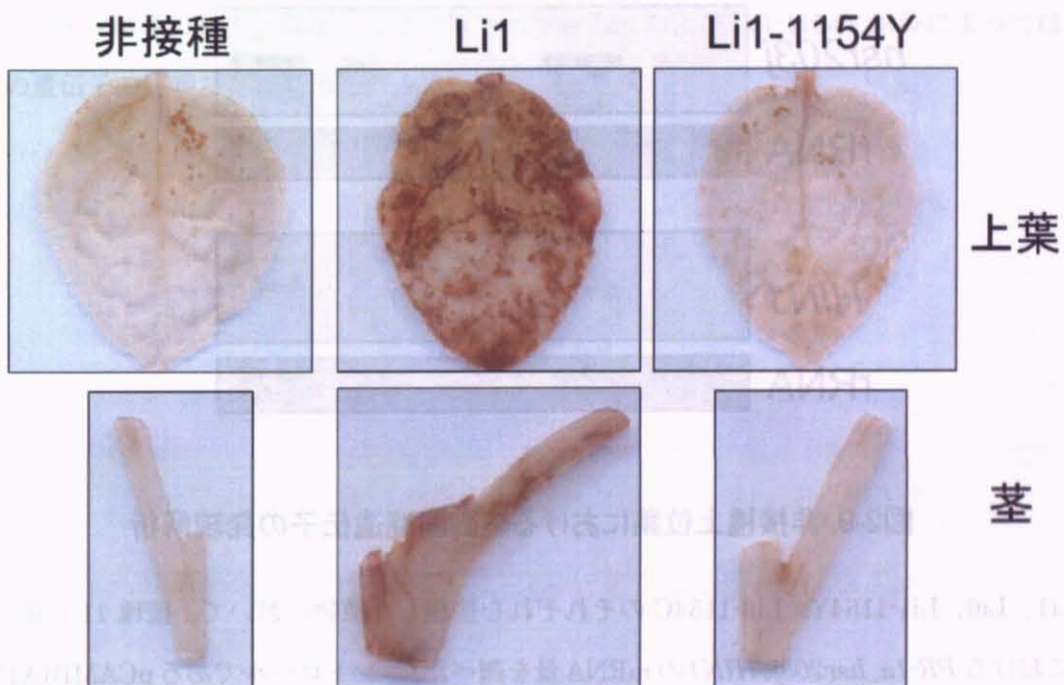


図2-8. 非接種上位葉におけるDAB染色法によるH₂O₂の検出

2.2.4 防御関連遺伝子の発現解析

Li1 および Li6-1154C 感染による壊死において、HR の特徴が認められた。HR においてはいくつかの防御関連遺伝子の発現が報告されていることから、壊死型の PIAMV の感染領域においても防御関連遺伝子の発現が誘導されていることが推測された。これを確かめる目的でノーザンブロット解析により、PIAMV 感染領域における *PR-1a*、*hsr203j*、*HIN1* の mRNA 量を調べた。

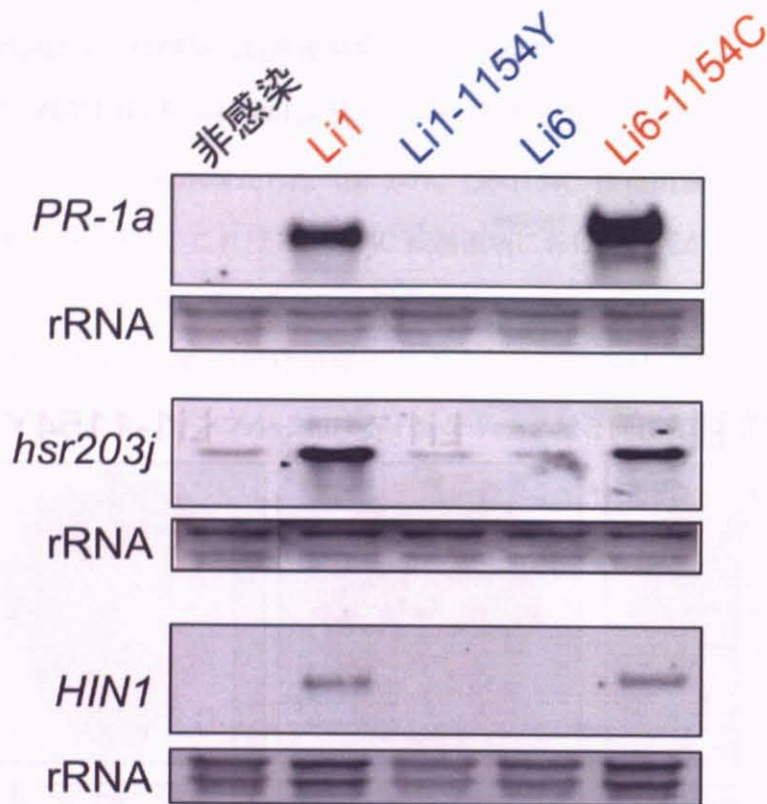


図2-9. 非接種上位葉における防御関連遺伝子の発現解析

Li1、Li6、Li1-1154Y、Li6-1154Cのそれぞれを接種した植物において、接種11日後の上葉における*PR-1a*、*hsr203j*、*HIN1*のmRNA量を調べた。コントロールであるpCAMBIA1301を注入した植物の上葉では、*PR-1a*、*hsr203j*のmRNAがわずかに検出され、*HIN1*のmRNAはほとんど確認できなかった。pCAMBIA1301の注入濃度は他のバイナリーベクターと同様に $OD_{600}=0.8$ であったが、この濃度においてはアグロバクテリウムの注入による植物体へのストレスは、非注入の上葉ではほとんど見られないことがわかった。壊死型のLi1およびLi6-1154C感染植物の上葉においては、*PR-1a*、*hsr203j*、*HIN1*のmRNA量はコントロールと比較して顕著に多かった(図2-9)。これに対して無病徴型のLi1-1154YおよびLi6感染植物の上葉においては*PR-1a*、*hsr203j*、*HIN1*のmRNA量はpCAMBIA1301を注入したコントロールとほぼ同程度であった。

次に、それぞれのウイルスの接種領域における防御関連遺伝子の発現解析をおこなった。接種領域においては、元来植物病原細菌であるアグロバクテリウムにより、PIAMVの感染と

は無関係に防御関連遺伝子の発現が誘導される可能性が考えられた。よって、コントロールとして pCAMBIA1301 を持つアグロバクテリウムの接種領域からも RNA を抽出し解析した。その結果、接種 3 日後に、壊死型の Li1 および Li6-1154C 接種領域においては *PR-1a*、*hsr203j*、*HIN1* の mRNA 量はコントロールと比較して顕著に多かった (図 2-10)。一方、無病徴型の Li6 および Li1-1154Y の接種領域での防御関連遺伝子の発現量は、pCAMBIA1301 を持つアグロバクテリウムの接種領域 (「アグロバクテリウム control」) における防御関連遺伝子の発現量と同程度であった。

これらの結果より、壊死型の Li1 および Li6-1154C 感染による壊死に伴い *PR-1a*、*hsr203j*、*HIN1* の発現誘導が認められた。一方で無病徴型の Li6 および Li1-1154Y 感染によってはこれらの遺伝子の発現誘導は認められなかった。

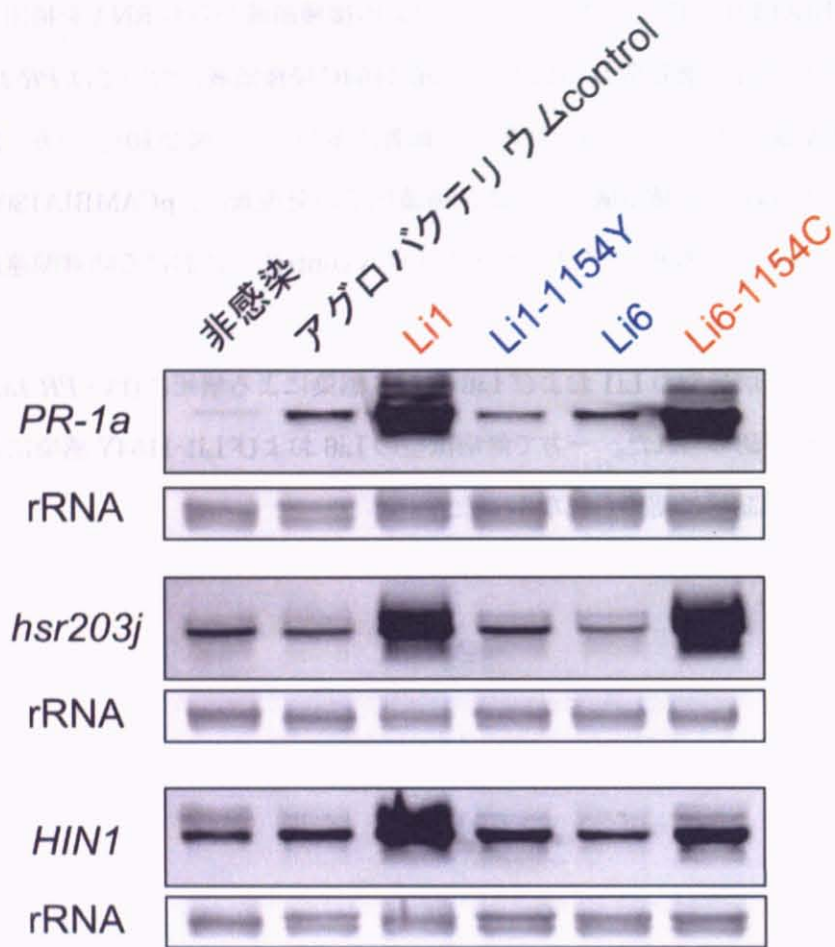


図 2-10. 接種領域における防御関連遺伝子の発現解析

2.3. 考察

2.3.1 全身壊死の解析系

感受性の植物にウイルスが引き起こす全身壊死には、これまで壊死を簡便に、かつ再現性よく解析しうる実験系が存在していなかった。その大きな理由として、ウイルスにより全身壊死が引き起こされる植物においては、ウイルスの初期感染細胞から全身の組織への移行とともに全身壊死が非同調的に誘導されるために解析が難しいという点が挙げられる。

このような非同調的な壊死の誘導は、典型的な HR である、*N* 遺伝子をもつタバコがタバコモザイクウイルス (*Tobacco mosaic virus*; TMV) に対して誘導する HR の際にも認められる。すなわち、TMV が *N* 遺伝子を持つタバコに引き起こす HR の局部壊死病斑は、TMV 接種後、TMV が侵入した個々の細胞とその周辺の細胞群に異なる日数で非同調的に形成される。この非同調的な壊死斑の形成は、壊死が局所的なものに限られる典型的な HR の解析においても問題点の一つであった。しかし、この TMV-*N* タバコの系においては、*N* 遺伝子産物が温度感受性であることを利用した同調的 HR 誘導系が開発された。すなわち、28°C 以上の時には HR が誘導されず TMV が全身感染することから、タバコを 28°C 以上に置いて TMV を全身感染させたのち、HR が引き起こされるような 27°C 以下に温度をシフトさせることにより、全身に同調的に HR を誘導することができる。この系により HR に伴う遺伝子発現やシグナル物質の解析が大きく前進した (Seo *et al.*, 2001)。

本研究では、ウイルスに感受性の植物における全身壊死についても、アグロバクテリウムを注入した領域のほとんどの細胞でほぼ一様に遺伝子の発現を引き起こせるアグロインフィルトレーション法を用い (Kapila *et al.*, 1997)、一様でかつ同調的な壊死を誘導する手法を構築した。本研究において壊死型の PIAMV をアグロインフィルトレーション法により接種後、観察を継続したところ、接種領域における同調的な壊死に引き続いて常に植物体の全身壊死が認められた。このことから、接種領域での一様な壊死と接種領域以外の全植物体における壊死 (全身壊死) は同様の機構によって引き起こされていると考えられる。一方、上葉など、接種領域以外における壊死はウイルスの移行に伴って引き起こされるため、一様には誘導されない。さらに、こうした全身感染組織では HR の指標が非特異的に検出されることも多く解析は難しい。しかし、接種領域での壊死と接種領域以外の全植物体における壊死が同様の機構であるという考えを支持するように、H₂O₂ は壊死型の PIAMV 分離株に特異的に検

出された (図 2-8)。これらの結果は、接種領域での一様な壊死の解析によって、全身壊死の機構を解析することができることを強く支持していると考えられた。

この系を用いることで、これまで顕微鏡下で観察するのが一般的であったトリパンブルー染色、アニリンブルー染色、DAB 染色などの HR の指標をマクロに観察することが可能となった (図 2-4,2-5,2-6)。また、PIAMV の感染に伴う壊死における防御関連遺伝子の発現解析を行うことも可能となった。一方で、アグロインフィルトレーション法は、植物病原細菌であるアグロバクテリウムがそのプラスミドを植物細胞内に送り込む能力を利用しているため、アグロインフィルトレーション法による接種領域の解析は、アグロバクテリウムによる影響を十分考慮すべきである。しかしながら、ウイルスを感染させ得ないアグロバクテリウム (本研究では、pCAMBIA1301 を保持するものを用いた) を接種した領域をコントロールとし比較することにより、アグロバクテリウムの感染による影響を回避できた (図 2-10)。このことは、アグロインフィルトレーションを用いた接種領域における壊死の解析系の有用性を示すものである。

本研究に限らず植物ウイルスの研究において、アグロインフィルトレーション法はその一様で同調的かつ、一過的なタンパク質の発現により、ウイルス複製 (Vlot *et al.*, 2001; Vlot *et al.*, 2002; Annamalai and Rao, 2005; Gopinath *et al.*, 2005)、細胞間移行 (Bayne *et al.*, 2005; Paape *et al.*, 2006)、RNA サイレncing (Llave *et al.*, 2002; Canto *et al.*, 2006; Chiba *et al.*, 2006) などの研究に幅広く用いられており、多くの知見が生み出されている。この点からも、本研究で用いたアグロインフィルトレーション法による植物ウイルスによる全身壊死の解析系は、他の全身壊死の研究にも応用できると考えられ非常に意義深い。

2.3.2 PIAMV 感染による全身壊死には HR が関わる

本研究では、PIAMV 感染による全身壊死に HR が関わっていることを HR の指標の検出によって明らかにした。壊死型の PIAMV (Li1 および Li6-1154C) の接種領域においては、TUNEL 法による解析で核 DNA の断片化が認められただけでなく、細胞壊死、H₂O₂ の生成、カロースの沈着、イオンリーク量の増大、さらには、防御関連遺伝子の発現誘導といった HR の指標が検出された。しかし、無病徴型の PIAMV (Li6 および Li1-1154Y) では、健全植物でも認められる維管束組織におけるカロース沈着が観察されるといった非感染組織と同程度の非特異的な反応を除き、HR の指標は検出されなかった。

実際、知見の乏しいこれまでの全身壊死の研究においても、PCD が起こっている例が報告されているだけでなく (Xu and Roossinck, 2000; Yao *et al.*, 2002)、 H_2O_2 の生成、カロースの沈着、防御関連遺伝子の発現誘導などの HR の指標が検出できると報告している研究もある (Xu *et al.*, 2003; Kurihara and Watanabe, 2004; Ehrenfeld *et al.*, 2005; Love *et al.*, 2005)。これらの研究における感受性の植物にウイルスが示す全身壊死においては、初期感染細胞へのウイルスの封じ込めは起こっていない。このような抵抗性 (初期感染細胞への封じ込め) を伴わないにもかかわらず HR と同様の特徴を持つ反応は「HR 様反応 (HR-like response)」と呼ばれてきた (Heath, 2000)。PIAMV による全身壊死は、封じ込めを伴わないこと、ならびに HR の指標が観察されることから、こうした既報の「HR 様反応」に類似している。しかし、接種領域と全身感染組織における壊死を比較し、これまで知られている HR の指標を包括的に解析したのは本研究がはじめてであり、この結果は既知の知見を含め、全身壊死に HR が関わっていることを支持している。

PIAMV 感染による全身壊死は防御関連遺伝子の発現を伴っていた (図 2-9)。*PR-1a* は感染特異的タンパク質遺伝子 (pathogenesis-related protein gene; PR protein gene) の一つであり、TMV・Nによる HR で誘導される (Cornelissen *et al.*, 1986) ほか、さまざまな病原体に対する抵抗性の植物における HR の際に発現が誘導されることが確認されている (Kiba *et al.*, 2003)。その発現は、抵抗性の植物と病原体の組み合わせのみならず、感受性の植物と病原体の相互作用においても、壊死病徴の発現とともに誘導される (Li *et al.*, 1999, Xin and Ding, 2003; Xu *et al.*, 2003)。*PR-1a* の発現は、HR の際に蓄積するサリチル酸によって誘導されるが、このサリチル酸は、HR の抵抗性に重要であるだけでなく (Kachroo *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2002)、ウイルスの蓄積や移行を抑制する働きが報告されている (Chivasa *et al.*, 1997; Naylor *et al.*, 1998)。*PR-1a* タンパク質が HR においていかなる役割を果たしているかは明らかではないが、*PR-1a* の発現誘導はウイルスを含む病原体に対する植物の防御機構発現の指標としてよく用いられている。本研究でこの *PR-1a* 遺伝子の発現が壊死型の PIAMV (Li1 ならびに Li6-1154C) 特異的に誘導されていたことは、この全身壊死が単にウイルスの過剰な蓄積により植物に引き起こされる反応ではなく、植物側からの積極的な防御反応の一環である可能性を示唆している。

hsr203j もまた、HR において誘導される防御関連遺伝子の一つである。TMV・Nにおける HR でも誘導され、特に PCD との関連が示唆されている (Pontier *et al.*, 1998, 1999)。実際、CMV と D サテライト RNA が感染したトマトに引き起こされる全身壊死は PCD を伴っ

ているが (Xu and Roossinck, 2000)、この際にも、壊死が肉眼で認められる以前の感染初期段階で *hsr203j* の発現が誘導されることが報告されている (Xu *et al.*, 2003)。このことから、*hsr203j* の発現誘導は HR において、特に PCD の活性化との関連が強いと考えられる。

HIN1 は、グラム陰性植物病原菌のタイプ III 分泌機構によって分泌され多くの植物に HR を誘導する非特異的エリシターである「ハーピン (harpin)」によって誘導される遺伝子 (harpin-induced protein 1) として初めて報告された (Gopalan *et al.*, 1996)。本遺伝子は植物病原細菌が抵抗性の植物に感染した際に速やかに誘導され、*hsr203j* と同様の発現パターンを示す (Gopalan *et al.*, 1996)。また植物ウイルスでも、TMV・*N* の HR の初期段階において *hsr203j* と同様に速やかに誘導される (Pontier *et al.*, 1999, Takahashi *et al.*, 2004)。また *HIN1* は HR に特異的に発現が誘導される *hsr203j* とは異なり、植物組織の老化 (senescence) においても発現が誘導されることがわかっている (Pontier *et al.*, 1999)。さらに、*HIN1*、*hsr203j* は PCD を阻害するカスパーゼ阻害剤によってその誘導が起こらなくなるが、PCD の阻害は *PR-1a* の発現誘導には影響しない (del Pozo and Lam, 1998)。このことから、*PR-1a* によって示される防御反応は、*HIN1* ならびに *hsr203j* の関わる PCD とは異なった経路により誘導されていることが示唆されており、*HIN1* ならびに *hsr203j* は主に PCD の指標として有用であると考えられる (del Pozo and Lam, 1998)。

PIAMV により感受性の植物に引き起こされる全身壊死において、抵抗性の植物が示す典型的な反応である HR と同様の遺伝子の発現が誘導されていることは、全身壊死と HR との植物における機能的な類似性を示唆しており、興味深い。また、これらの防御関連遺伝子産物は、植物における HR による抵抗性の誘導カスケードの各段階 (SGT1 や RAR1 の関与する段階や、MAP キナーゼの関与する段階など) においてそれぞれ特異的に誘導されていることを示す報告もある (光原ら、2006)。以上から、時系列的にこれらの遺伝子の発現誘導を解析することなどにより、それぞれの遺伝子の、壊死の発現に至る過程における機能を解明しうる可能性もある。