

3. PIAMV 感染による全身壊死誘導メカニズムの解析

前章では、壊死型の PIAMV の *N. benthamiana* への感染により引き起こされる全身壊死において各種の HR の指標が認められることを示した。このことから、本来は抵抗性の植物が示す局所的な細胞死である HR が全身壊死に関わっていることが示された。

本章では、*Tobacco rattle virus* (TRV) ベクターによる virus-induced gene silencing (VIGS: ウイルス誘導ジーンサイレンシング) 法 (Dinesh-Kumar *et al.*, 2003) による植物遺伝子のノックダウンとアグロインフィルトレーション法によるウイルス接種を利用し、PIAMV による全身壊死誘導に関わる植物のカスケードについて解析した。具体的には、全身壊死に HR が関わることを示されたことから、既によく研究されている HR のカスケードが全身壊死の誘導にも関わっていると推測し、HR の誘導カスケードに関与することが報告されている宿主因子 SGT1 および RAR1 のノックダウンを試みた。その結果、SGT1 あるいは RAR1 のノックダウンにより Li1 による壊死が抑制され、さらに、このとき、Li1 により壊死が引き起こされる直前の時期に、Li1 のウイルス蓄積量が増加することが明らかとなった。これらの結果より、PIAMV による全身壊死誘導メカニズムについて考察する。

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

PIAMV-Li 分離株である Li1 および Li6 ウイルスゲノム RNA を元に構築した感染性バイナリーベクター-pLi1 および pLi6 については前章の 2.1.1 節において記したとおりである。また Li1 による全身壊死の決定因子である複製酵素の 1154 番目のアミノ酸を Li1 と Li6 の間で相互に入れ替えることにより作製した pLi1-1154Y、pLi6-1154C についても同じく 2.1.1 節で述べた。本章では、全身壊死病徴を示す Li1 および無病徴感染する Li1-1154Y を用いて、全身壊死誘導のカスケードについての解析を行った。

ウイルスの接種は、アグロインフィルトレーション法により pLi1 および pLi1-1154Y 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。接種植物である *N. benthamiana* とその生育法、アグロバクテリウムの形質転換、アグロインフィルトレーション法については 2.1.1 節で述べた。また、PVX に対する抵抗性遺伝子である Rx の形質転換 *N. benthamiana* は Baulcombe 博士から分譲していただいた (Bendahmane *et al.*, 1999)。

また、PVX-GFP は Baulcombe 博士から分譲していただいたクローンを (Santa Cruz *et al.*, 1996)、本研究室にてバイナリーベクター-pCAMBIA1301 の *Sac*I サイトと *Pma*CI サイトの間に挿入し、アグロインフィルトレーション法による接種を可能にしたものを用いた。

PIAMV のバイナリーベクター (pLi1 および pLi1-1154Y) および PVX-GFP の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接種濃度は $OD_{600}=0.05$ とした。また本章においても、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呼称により示すこととした (ただし、ベクターの名称につける「p」は除いた)。

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

HR に関与する宿主因子のクローニング

N. benthamiana の展開葉を液体窒素により凍結・磨砕後、2.1.4 節で前述した ISOGEN を用いた方法により全 RNA を抽出した。全 RNA を鋳型として、reverse transcription-polymerase chain

reaction (RT-PCR) 法によって HR に関与する因子である *NbSGT1* および *NbRARI* (今後、*N. benthamiana* 由来の遺伝子であることを、遺伝子名の前に「Nb」を付記することで示す) の cDNA 部分断片を増幅し、*Tobacco rattle virus* (TRV) の RNA2 を改変したベクターである pTV:00 ベクターのマルチクローニングサイトにそれぞれクローニングした。

VIGS 法によるノックダウン実験の概略は図 3-1 に示した。なお、VIGS に用いた TRV ベクター (pTV:00 および pBINTRA6) は Baulcombe 博士から分譲していただいた。TRV は RNA1 と RNA2 の 2 分節のゲノムをもつ RNA ウイルスである。TRV ベクターは PIAMV の感染性バイナリーベクターと同様、TRV ゲノムの cDNA がバイナリーベクターにクローニングされ、アグロインフィルトレーション接種が可能になっている。RNA2 由来の pTV:00 にはマルチクローニングサイトがあり、この領域にノックダウンしたい遺伝子断片をクローニングする。接種は、pTV:00 もしくは pTV:00 に標的遺伝子断片をクローニングした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、RNA1 由来の pBINTRA6 を形質転換したアグロバクテリウムと等量混合しアグロインフィルトレーションすることで行う (Ratcliff *et al.*, 2001)。

SGT1、RARI それぞれの宿主因子を 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 *NbSGT1*、*NbRARI* のそれぞれに対して設計した。*NbSGT1* に対しては 5'- CGC AAG CTT

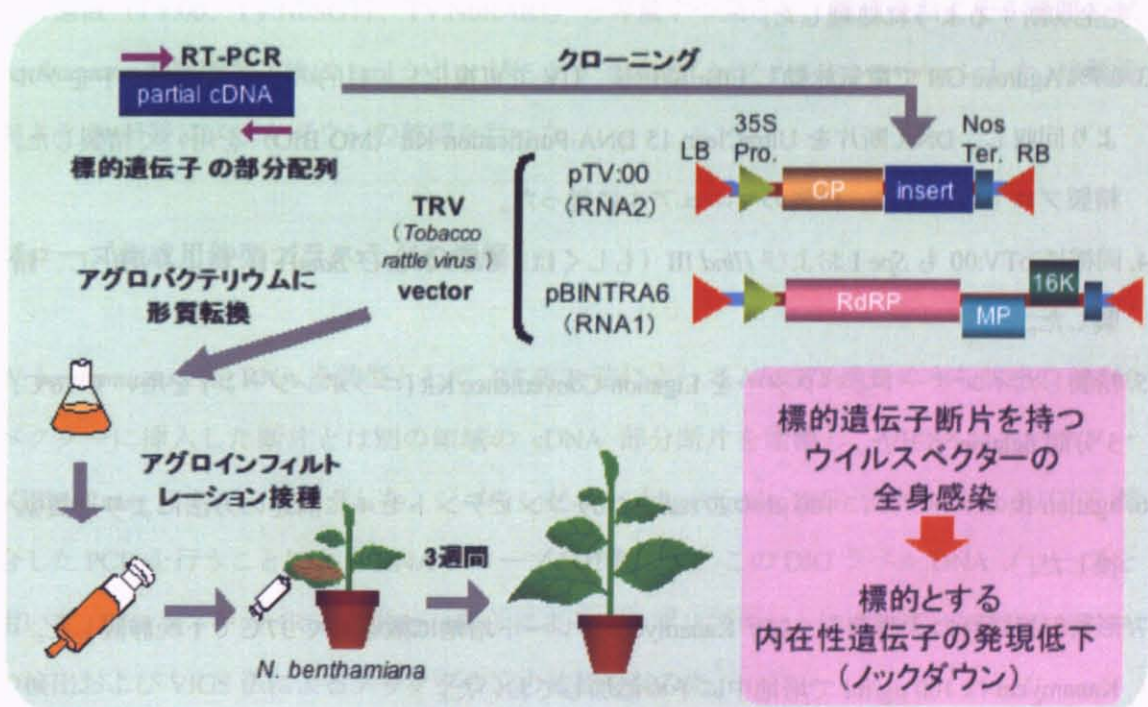


図 3-1. VIGS (virus-induced gene silencing) 法による植物の内在性遺伝子のノックダウンの概略図

CCC GGG ACT TAG TGT TAG CAT TGA TGT G -3' (HdSm-SGT1-614F) および 5' - GCG ACT AGT GGA TCC CTA GAT TTC CCA TTT CTT CAG C -3' (SpBm-SGT1-1114R) を用いた。また *NbRARI* には 5'- CCA TCG ATG GTT CAC AAC CCA GAG AAG T -3' (NiRARI-331F) および 5' - CGG GAT CCT TAG GAC GCT GGG CTG GC -3' (NiRARI-666R) を用いた。

RT-PCR 法は RNA LA PCR kit (AMV) ver1.1 (TaKaRa) を用い、2.1.4 節で前述したとおりに行った。

RT-PCR により増幅された *NbSGT1* および *NbRARI* の cDNA 部分断片はそれぞれ 500、336 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、*NbSGT1*、*NbRARI* 増幅断片は以下のような手順で、プラスミドベクター pTV:00 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 *Spe* I および *Hind* III (*NbSGT1*) もしくは *Cla* I および *Bam* H I (*NbRARI*) により完全切断するように処理した。
3. 0.7% Agarose Gel で電気泳動し EtBr 染色後、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。
4. 同様に pTV:00 も *Spe* I および *Hind* III (もしくは、*Cla* I および *Bam* H I) により消化し、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 させた。
6. ligation 後のサンプルに 100 µl の *E. coli* JM109 コンピテントセルに前述の方法により形質転換した。
7. 形質転換された大腸菌を、LB/ Kanamycin プレート培地に散布して 37°C で 1 晩静置した。Kanamycin は 100 µg/ml で培地中に予め添加しておいた。
8. いくつかのコロニーを選び、LB 液体培地/ Kanamycin 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。

9. プラスミドを、クローニングに用いた酵素で切断し insert のチェックを行った。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、pTV:00 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 TRV-F primer (5'- GCT GCT AGT TCA TCT GCA C-3) および TRV-R primer (5'- GCA CGG ATC TAC TTA AAG AAC -3) を用いた。シーケンスの方法および塩基配列の解析は、2.1.4 節の方法に従った。
10. 目的の配列が挿入されていたクローンを選び、pSoup が既に形質転換されているアグロバクテリウム GV3101 株 (Hellens *et al.*, 2000) に形質転換した。

VIGS 誘導のためのアグロインフィルトレーション

TRV の RNA1 由来のバイナリーベクターである pBINTRA6、RNA2 由来の pTV:00、pTV:NbSGT1、pTV:NbRAR1 を形質転換したアグロバクテリウム (それぞれ RNA1、TV:00、TV:NbSGT1、TV:NbRAR1 と呼ぶ) の単一のコロニーを LB 液体培地/ Kanamycin で 28°C、16 時間振盪培養した。2.1.1 節で述べた方法により、それぞれの菌体をインフィルトレーションバッファーに再懸濁し、分光光度計により OD₆₀₀=0.5 に調節した。RNA1 の菌液を TV:00 由来の菌液 (TV:00、TV:NbSGT1、TV:NbRAR1) と等量ずつ混合し、播種後およそ 3 週間の *N. benthamiana* の展開葉 2 枚に 1 ml シリンジによりアグロインフィルトレーションした。接種後およそ 21 日後にノックダウンの確認を行った。

プローブ作成用鋳型プラスミドの構築

N. benthamiana の全 RNA を鋳型として、RT-PCR 法によって *NbSGT1* 全長のうち前述の TV:00 ベクターに挿入した断片とは別の領域の cDNA 部分断片を増幅し、プラスミドベクター pGEM-T easy にクローニングした。ジゴキシゲニン (digoxigenin; DIG) を付加した dUTP を混合した PCR を行うことにより DNA プローブを作製した。この DIG ラベル DNA プローブを用いて、DIG システム (Roche Diagnostics) によるノーザンプロットによって、SGT1 の mRNA の検出および VIGS 法によるノックダウンの確認を試みた。

N. benthamiana からの全 RNA の抽出は ISOGEN (Nippon Gene) を用いて行った。SGT1 を

PCR 増幅するために、5'末端特異的プライマーと 3'末端特異的プライマーを *NbSGT1* に関して設計した。*NbSGT1* に対して 5'- ATG GCG TCC GAT CTG GAG A -3' (SGT1-1F) および 5'-TGC TAA ACT AGC ACC AGT TTC C -3' (SGT1-300R) を用いた。

RT-PCR 法により増幅した SGT1 の 300bp の断片は、前述の方法により pGEM-T easy ベクターにクローニングし、このベクターを pGEM-SGT1-300 と名づけた。

PCR 法による DNA プローブの作製

pGEM-T easy ベクター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') を用いて、pGEM-SGT1-300 をテンプレートとして PCR を行った。増幅された DNA 断片を UltraClean 15 DNA Purification Kit (MO BIO) を用いて精製後、精製した DNA 断片をテンプレートとして PCR 法による DIG ラベリングを行った。PCR 法による DIG ラベリングは、PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics) を用い、方法は付属のプロトコルによって行った。

精製した DNA 断片 (10-100 pg/ μ l)	1 μ l
10x PCR buffer	5 μ l
10x PCR DIG probe synthesis mix	5 μ l
SGT1-1F (10 μ M)	2 μ l
SGT1-300R (10 μ M)	2 μ l
DW	34.25 μ l
Enzyme mix	0.75 μ l
Total	50 μ l

PCR の反応温度条件はすでに述べた方法で行った。反応後、電気泳動により DIG ラベルされた DNA プローブの増幅を確認し、そのままノーザンブロット解析に用いた。

ノーザンブロット解析

TV:00 を接種しておよそ 21 日経過した TV:00 接种植物および TV:*NbSGT1* 植物より全 RNA を抽出し、ノーザンブロット解析により *NbSGT1* の転写量を解析した。その具体的な手順については 2.1.4 節に記した。なお、用いた DIG ラベル DNA プローブはハイブリバッファー 1 ml に対して 2 μ l を加え、またハイブリダイゼーションの温度は 50 $^{\circ}$ C とした。

半定量的 RT-PCR

TV:00 を接種しておよそ 21 日経過した TV:00 感染植物および TV:NbRARI 感染植物より全 RNA を抽出し、半定量的 RT-PCR (semi-quantitative RT-PCR) 法により *NbRARI* の mRNA 量の定量を行った。

TV:00 感染植物および TV:NbRARI 感染植物より抽出した全 RNA 500 ng をテンプレートとして、RT-PCR 法を行った。TaKaRa の RNA LA PCR Kit を用いて oligo dT プライマーにより、下記の反応液組成で 42°C 30 分、99°C 5 分にて逆転写反応を行った。

全 RNA (500 ng)	x μ l
10 x RNA PCR buffer	1 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	2 μ l
dNTP(10 mM)	1 μ l
Oligo dT Adaptor primer (2.5 μ M)	0.5 μ l
RNase Inhibitor	0.5 μ l
DW	4.5-x μ l
AMV Reverse Transcriptase XL (5 U/ μ l)	0.5 μ l
Total	10 μ l

次に、逆転写した cDNA をテンプレートとして、下記の反応液組成にて PCR を行った。TV:00 感染植物および TV:NbRARI 感染植物由来の全 RNA から逆転写した cDNA をテンプレートとして、*NbRARI* 特異的なプライマーで増幅した。また、両植物間でテンプレートとなる全 RNA 量が揃っていることを確認するために、内部標準遺伝子としてユビキチンを用いた。

半定量的 RT-PCR のために *NbRARI* に対して設計したプライマーは、5'-CCA TCG ATA TGG AGA GCT TCG TTG CCA GA -3' (*NbRARI*-1F) および 5'-CGG GAT CCG TGA TCA GAA CAA AAG AAT CCC -3' (*NbRARI*-330R) を用いた。ユビキチンに対して設計したプライマーは、5'-CGG CAT GCT TAA CAC ATG CA -3' (*UBI*-26F) および 5'-AGC CGT TTC CAG CTG TTG TTC -3' (*UBI*-136R) を用いた。

逆転写した cDNA	0.3 μ l	94°C	4:00	} 41 cycle
10x PCR buffer	2 μ l	94°C	0:30	
dNTP (10 mM)	2 μ l	53°C	0:15	
F Primer (10 μ M)	0.8 μ l	72°C	0:30	
R Primer (10 μ M)	0.8 μ l	72°C	7:00	
DDW	13.6 μ l	4°C	∞	
TaKaRa rTaq (5 U/ μ l)	0.5 μ l			
total	20 μ l			

下に示したそれぞれのテンプレート/プライマーの組み合わせごとに5チューブずつ用意し、サイクル数が25、29、33、37、41のときに1チューブずつサンプルとして回収し、2.0% Agarose Gel を用いて、電気泳動した。

<テンプレートとプライマーの組み合わせ>

テンプレート	プライマー
TV:00	NbRAR1 特異的プライマー
TV:00	ユビキチン特異的プライマー
TV:NbRAR1	NbRAR1 特異的プライマー
TV:NbRAR1	ユビキチン特異的プライマー

3.1.3 SGT1・RAR1 ノックダウン植物への PIAMV の接種

ノックダウン植物への PIAMV の接種

N. benthamiana に TV:00 あるいは TV:NbSGT1、TV:NbRAR1 を接種後、およそ3週間後に標的遺伝子のノックダウンが誘導されていることを確認し、PIAMV の接種を行った。PIAMV の接種はアグロインフィルトレーション法により、接種濃度は $OD_{600}=0.05$ で行った。

DAB 染色・イオンリーク量の測定・ノーザンプロット解析

PIAMV の Lil および Lil-1154Y を接種した接種葉について、2.1.2 節に前述の方法により DAB 染色およびイオンリーク量の測定を行い、また 2.1.4 節に前述の方法によりノーザンプロット解析を行った。

3.2. 結果

3.2.1 SGT1・RAR1 のノックダウン解析

HR の誘導カスケードに関与することが報告されている宿主因子 SGT1、RAR1 を VIGS 法によりノックダウンする目的で、TRV ベクター (TV:00) をもとに TV:NbSGT1 および TV:NbRAR1 を作製した。これらをアグロバクテリウムに形質転換し、アグロインフィルトレーション法によって *N. benthamiana* に接種した。コントロールには TV:00 を用いた。接種3週間後に非接種の上葉から全 RNA を抽出しノーザンブロット解析を行ったところ、TV:00 を接種した植物では SGT1 に特異的なシグナルが見られたのに対して、TV:NbSGT1 を接種した植物では特異的なシグナルは見られなかった (図 3-2A)。一方、TV:NbRAR1 感染植物体の非接種上葉より抽出した全 RNA を用いて半定量的 RT-PCR を行ったところ、内部コントロールであるユビキチンの mRNA 量は TV:00 を接種した植物体と同様の増幅パターンを示したのに

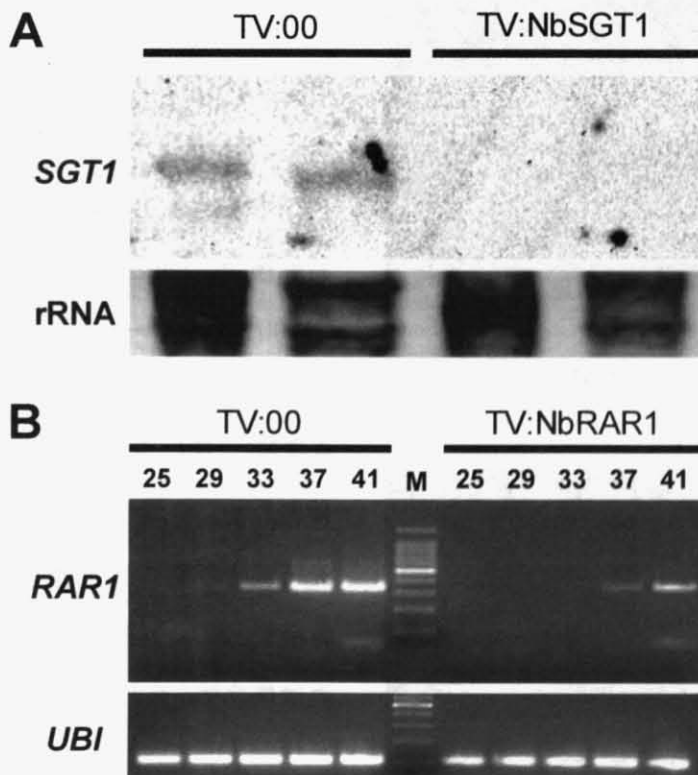


図 3-2. VIGS 法によるノックダウンの確認。A: ノーザンブロット解析による SGT1 の mRNA の検出。左2レーンがコントロールの TV:00 感染植物、右2レーンが TV:NbSGT1 感染植物。各レーン、全 RNA を 5 μ g 泳動した。rRNA: リボソーム RNA (control)。B: 半定量 RT-PCR による RAR1 の mRNA の検出。左が TV:00 感染植物、右が TV:NbRAR1 感染植物。UBI: ユビキチンの RT-PCR 産物 (control)

対し、RAR1 の mRNA 量を示すシグナルの増幅が遅れたことから RAR1 の mRNA 量が減少していることを確認した (図 3-2B)。また、TV:NbSGT1 感染植物は、既に報告されているように、TV:00 感染植物に比べ、植物の丈が低くなるとともに枝分かれの多いことが観察された

(Peart *et al.*, 2002)。以上の結果より、作製したコンストラクトによる VIGS 法により、目的の遺伝子のノックダウンが起こっていることを確認できた。

次に、作製したコンストラクトによる VIGS 法とノックダウンの有効性を、既に知られている HR の実験系を用いて確認した。SGT1 は、NBS-LRR 型の R 遺伝子である Rx 遺伝子に依存的な PVX への抵抗性に必須な因子であることがすでに報告されている (Peart *et al.*, 2002)。Rx 形質転換 *N. benthamiana* は GFP を発現する PVX (PVX-GFP) に対して抵抗性であり、接種葉でも上葉でも PVX 感染の指標である GFP 蛍光が観察されないことが示されている (Bendahmane *et al.*, 1999)。そこで、この Rx 遺伝子を形質転換した *N. benthamiana* に TV:NbSGT1 を接種し SGT1 の VIGS を誘導した。もし SGT1 がノックダウンされれば、PVX への抵抗性が打破され、PVX-GFP を Rx 形質転換 *N. benthamiana* した際に PVX 感染の指標である GFP 蛍光が認められるはずである。Rx 形質転換 *N. benthamiana* にコントロールの TV:00 を接種し、3 週間後に PVX-GFP をアグロインフィルトレーションによって接種すると、接種領域に HR が

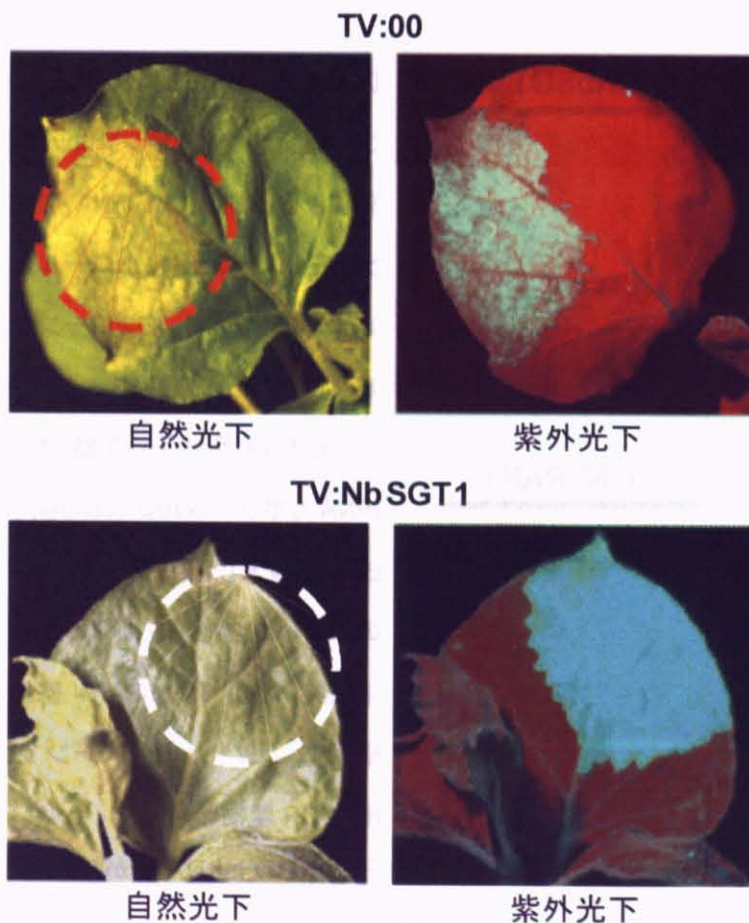


図 3-3. SGT1 ノックダウンによる、Rx タンパク質による PVX 抵抗性への影響。Rx 形質転換 *N. benthamiana* に TV:00(コントロール)もしくは TV:NbSGT1(SGT1 down) を接種し、後に PVX-GFP を接種した。接種領域の自然光下および紫外光下の写真を示す。赤丸は細胞死を、白丸は無病徴を表わす。

誘導され GFP 蛍光は観察されなかった。また、上葉においても PVX による病徴および GFP 蛍光は認められなかった。これに対して、Rx 形質転換 *N. benthamiana* に TV:NbSGT1 を接種し

3週間後に PVX-GFP を接種すると、HR が抑制され、ウイルスの増殖を示す GFP 蛍光が観察された (図 3-3)。また、上葉においては PVX による GFP 蛍光と軽微なモザイク症状が観察された。以上の結果は、既報の結果を正しく再現しており (Peart *et al.*, 2002)、よって SGT1 が作製した TV:NbSGT1 によってノックダウンされたこと、SGT1 がウイルスに抵抗性の植物における HR とウイルスの封じ込めに関与することが確認されるとともに、本研究で用いる VIGS の系が有効であることが示された。

3.2.2 SGT1-RAR1 の PIAMV 感染に伴う全身壊死への影響

次に、野生型の *N. benthamiana* において、SGT1 および RAR1 ノックダウンが PIAMV 感染による壊死へ与える影響を解析した。TV:00 および TV:NbSGT1 接種3週間後に、それぞれの感染植物の展開葉に Li1 (壊死型) および Li1-I154Y (無病徴型) を接種した。接種7日後までに、TV:00 感染植物では Li1 接種領域において壊死が観察されたのに対して、Li1-I154Y 接種領域においては壊死は観察されず、2章で示した結果と同様に、TRV ベクターを接種していない *N. benthamiana* に両ウイルスを接種したときの結果と同様であった。一方、TV:NbSGT1 感染植物では Li1 接種領域における壊死は抑制され、DAB 染色によっても、 H_2O_2 の蓄積を示す茶褐色の染色が検出されなかった。また TV:NbSGT1 感染植物における Li1-I154Y 接種領域も無病徴であり、 H_2O_2 も検出されなかった (図 3-4A)。さらに TV:NbRAR1 感染植物でも接種8日後に Li1 接種領域における壊死は抑制され、 H_2O_2 の蓄積は検出されなかった。また TV:NbRAR1 感染植物においても、TV:00 感染植物と同様、Li1-I154Y の接種領域は無病徴であった (図 3-4A)。これらの結果から、SGT1 ノックダウンによって、壊死型 PIAMV (Li1) 感染による壊死が抑制されることがわかった。

次に TV:NbSGT1 感染植物における、壊死型 PIAMV による壊死の抑制を定量的に比較するために、TV:00 感染植物と TV:NbSGT1 感染植物を用いて、Li1 接種領域におけるイオンリーク解析を行った。接種7日後に、TV:NbSGT1 感染植物では Li1 接種領域におけるイオンリーク量は TV:00 感染植物に比較して顕著に少なかった (図 3-4B)。同様に、TV:NbRAR1 感染植物では Li1 接種領域におけるイオンリーク量は TV:00 感染植物に比較して顕著に少なかった (図 3-4B)。

この壊死の抑制が、Li1 の接種領域だけでなく、Li1 が全身感染した組織でも観察されるか

どうかを調べるため、TV:00、TV:NbSGT1、TV:NbRAR1 感染植物（それぞれの TRV ベクター接種後 4 週間）に Li1 を OD₆₀₀=1.0 で接種し、12 日後に上葉での病徴を観察した。その結果、TV:00 感染植物の茎頂付近の新しく出てきた上葉では Li1 に典型的な壊死の病徴が観察されたが、TV:SGT1 および TV:NbRAR1 感染植物の上葉では壊死の病徴は軽減または抑制されることが確認された（図 3-5）。この結果より、SGT1 および RAR1 ノックダウンにより、壊死型の PIAMV による壊死が、接種領域のみならず全身感染組織でも抑制されることが示された。

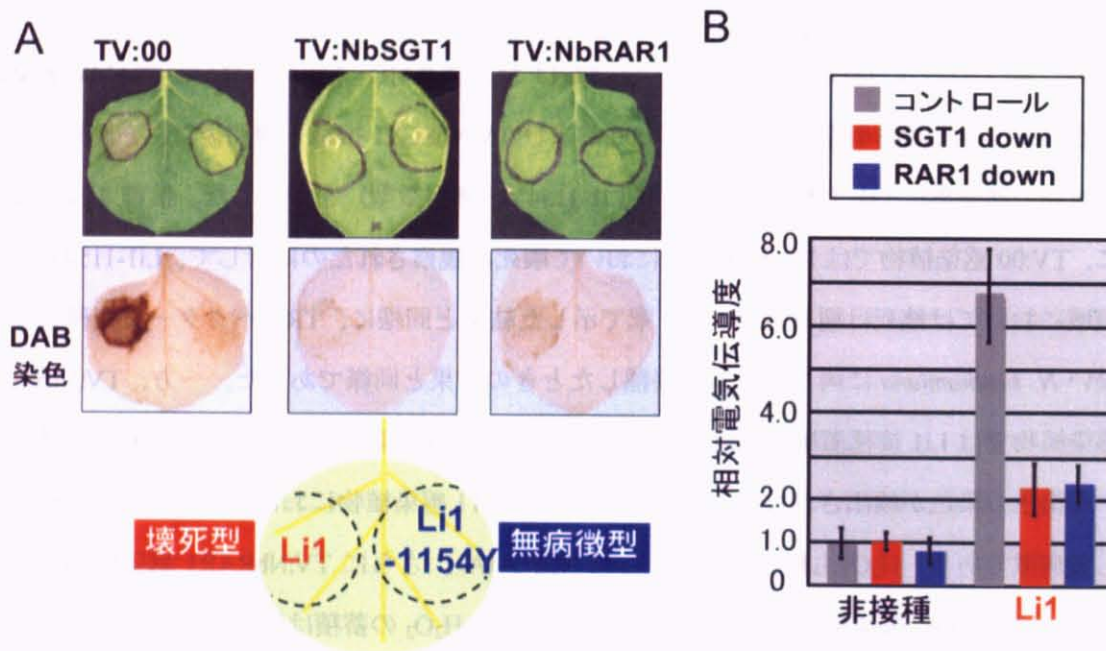


図 3-4. SGT1、RAR1 のノックダウンの、PIAMV 感染による壊死への影響。A: TV:00、TV:NbSGT1、TV:NbRAR1 感染植物における、Li1 (壊死型、葉の左半分に接種)と Li1-1154Y (無病徴型、葉の右半分に接種)の接種領域の病徴と、DAB 染色による H₂O₂ の検出。TV:NbRAR1 のみ接種 8 日後、その他は接種 7 日後。B: イオンリーク解析。PIAMV 接種 7 日後における結果。

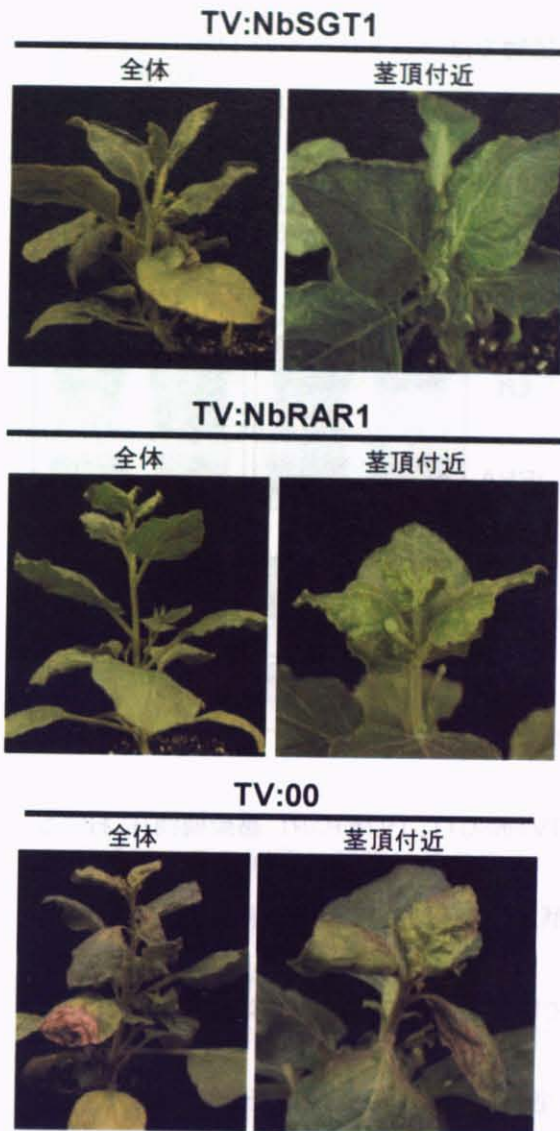


図 3-5. SGT1、RAR1 のノックダウンの、

Li1 による全身壊死への影響。

PIAMV-Li1 を接種後 12 日における植

物体全体および、茎頂付近の新しい葉

の写真をそれぞれ示した。

3.2.3 SGT1・RAR1 の PIAMV 蓄積量への影響

SGT1 あるいは RAR1 をノックダウンしてもアグロインフィルトレーションによるタンパク質の発現量は影響を受けないことが示されている (Peart *et al.*, 2002)。しかし、TV:NbSGT1 および TV:NbRAR1 感染植物において Li1 による壊死が抑制された原因として、SGT1 あるいは RAR1 が PIAMV の増殖に必要な因子であり、これらの因子のサイレンシングにより PIAMV の増殖が抑制され壊死が軽減したという可能性も考えられた。そこで TV:NbSGT1 および TV:NbRAR1 感染植物に Li1 と Li1-I154Y をそれぞれアグロインフィルトレーション接種し、ノーザンブロット解析により接種領域でのウイルス蓄積量を調べた。その結果、PIAMV 接種

4日後における Li1 の蓄積量は、TV:NbSGT1 感染植物ではコントロールの TV:00 感染植物に比較して多く、Li1-1154Y の蓄積量はコントロールと同程度であった (図 3-6)。また同様に TV:NbRAR1 感染植物でも 4 日後において Li1 の蓄積量はコントロールと比較して多く、Li1-1154Y の蓄積量はコントロールと顕著な差は見られなかった (図 3-6)。

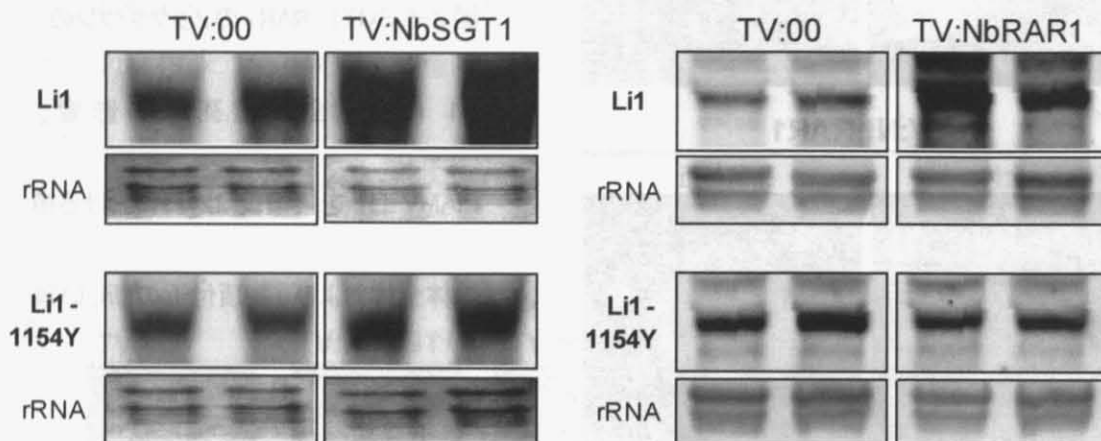


図 3-6. SGT1、RAR1 をノックダウンした植物 (TV:NbSGT1、TV:NbRAR1 感染植物) における PIAMV の蓄積量のノーザンブロット解析。上段が Li1 (壊死型)、下段が Li1-1154Y (無病徴型) の結果。PIAMV 接種 4 日後 (Li1 の接種領域で壊死が肉眼で観察されはじめる程度) に、それぞれ 2 反復ずつ PIAMV の RNA を検出した。各レーン 5 μ g の全 RNA を泳動した。

以上の結果から、PIAMV-Li1 接種領域における壊死は SGT1 および RAR1 依存的に誘導されることが明らかとなった。また SGT1 あるいは RAR1 をノックダウンすると、通常壊死が引き起こされる直前の時期 (PIAMV の接種 4 日後) において、接種領域における Li1 (壊死型) のウイルス蓄積量は増加したが、壊死を引き起こさない Li1-1154Y のウイルス蓄積量は変化しなかった。すなわち、接種領域における Li1 (壊死型) のウイルス蓄積量は見かけ上減少していることが示された。

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

第2章までの結果より、既によく研究されている HR の誘導カスケードが、PIAMV による全身壊死の誘導にも関わっている可能性が考えられた。本章で解析した SGT1 および RARI は、抵抗性の植物とウイルスとの相互作用において、R タンパク質の構造 (TIR-NBS-LRR 型もしくは CC-NBS-LRR 型) によらず HR 誘導カスケードに必須な因子である。このことは、図 3-3 に示し、また既に報告されているように (Peart *et al.*, 2002)、Rx タンパク質を持つ植物の PVX に対する抵抗性が、SGT1 のノックダウンにより抑制されることからわかる。しかし、SGT1 ならびに RARI が、植物ウイルスが感受性の植物に対して引き起こす全身壊死の発現にも関与していることを示したのは本研究がはじめてである。

本章においても前章と同様、アグロインフィルトレーションによる接種領域の壊死に着目して宿主因子の解析をおこなったが、図 3-5 に示すように、SGT1 ならびに RARI のノックダウンは接種領域のみならずウイルスが全身感染した上葉における壊死も抑制した。この結果は、HR の誘導カスケードが非接種上葉における壊死の誘導に関与していることを支持するとともに、アグロインフィルトレーションの接種領域における壊死が全身壊死と同様の挙動を示すことをあらわしており、アグロインフィルトレーションの接種領域を解析することで全身壊死を簡便に解析できるという本研究の実験系の妥当性を示している。

前章で既に、壊死型の PIAMV 分離株による *N. benthamiana* の全身壊死には、抵抗性 (初期感染細胞への封じ込め) を伴わないにも関わらず HR が関与していることが示されている。この前章の結果と本章で示された HR のカスケードの共通性はともに、感受性における全身壊死は抵抗性における HR と同じ反応であるという、既に提案されている仮説を裏付ける結果である (Bendahmane *et al.*, 1999)。HR 誘導カスケードにおける SGT1 と RARI の役割は主として R タンパク質の安定化作用であると考えられていることから (Peart *et al.*, 2002; Bieri *et al.*, 2004)、*N. benthamiana* において、PIAMV に対する R タンパク質様の因子が存在している可能性がある。実際に、インゲンマメに存在する *Cucumber mosaic virus* (CMV) に対する R タンパク質も、ヘテロな宿主である *N. benthamiana* に形質転換すると、

CMV に対して全身壊死を誘導することが報告された (Seo *et al.*, 2006)。また、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) においても、*Tobacco ringspot virus* (TRSV) の全身壊死に関与する R タンパク質が報告された (Nam *et al.*, 2006)。これらの知見は、感受性の植物に対するウイルスの病徴と考えられてきた全身壊死が、抵抗性の植物に典型的に認められる HR と同様の、おそらくは R タンパク質が関わる機構で引き起こされているとする本研究の結果を支持している。この CMV や TRSV の全身壊死に SGT1 や RAR1 などの因子が関与するのかは解析されていないが、興味深い。

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

前節 (3.3.1) において述べたように、SGT1 あるいは RAR1 のノックダウンにより壊死型の Li1 が *N. benthamiana* に引き起こす壊死病徴が抑制されたが、その際の Li1 のウイルス蓄積量はコントロールに比較して増加していた (図 3-6)。一方、無病徴型の Li1-1154Y のウイルス蓄積量はこれらの因子をノックダウンしても変わらなかった。このことから、SGT1 と RAR1 を介したカスケードは、壊死型の PIAMV による壊死の誘導に関与するだけでなく、壊死型の PIAMV 特異的に、その蓄積量を抑制していることが考えられる。

図 3-6 のウイルス蓄積量のノーザンブロット解析は、壊死型の Li1 の接種領域における壊死病徴が顕著に現れる前 (PIAMV 接種 4 日後) に行っている。このことは、壊死型の PIAMV が感染すると、壊死病徴が顕著に現れる前の段階において、ウイルスの蓄積量が SGT1、RAR1 依存的に抑制されていることを示している。

この壊死型の PIAMV に特異的なウイルス蓄積量の抑制の機構としてはいくつかの可能性が考えられる。一つは接種 4 日後には、壊死がようやく肉眼で見え始める程度には起こっており、ウイルスは寄生的な病原体であることから、壊死そのものが蓄積量を抑えている可能性である。もう一つは、壊死とは全く別個の機構として、壊死型の PIAMV 特異的に、ウイルス蓄積量を抑制するような植物の反応が引き起こされている可能性である。

前者の場合、SGT1、RAR1 ノックダウンでウイルス蓄積量が増えるのは壊死型の Li1 のみであることをよく説明できる。しかし、SGT1、RAR1 ノックダウンによって明らかになるこのウイルス蓄積量の抑制は、両因子をノックダウンしない場合に Li1 の壊死が顕著になる前の時期から見られる。このことから、壊死が直接的に Li1 の蓄積量を減少させている、と本段階ではっきりと主張することは難しい。今後より詳細に、肉眼では観察できない程

度のミクロなレベルでの壊死が進行しているか、またそれとウイルス蓄積量の減少が関連しているのかを解析していく必要があると考えられる。

また後者の、壊死とは全く別個の機構としてウイルス蓄積量を抑制するような反応が引き起こされている可能性については、これまで、抵抗性の HR における「細胞死」が、「病原体の封じ込め」とは別個の二次的な反応であることを示唆する報告があり (Bendahmane *et al.*, 1999)、その知見と合致する。CMV がトマトに引き起こす全身壊死で既に示唆されているように、全身壊死においても防御関連遺伝子やカロースの沈着などを含む HR の反応により、ウイルスが封じ込められるほど強くはないもののウイルス蓄積量の抑制が起きており、そののち二次的な反応として壊死が起こっているという報告もある (Xu *et al.*, 2003)。本研究の PIAMV においても同様に、壊死とは別個にウイルス蓄積量の抑制反応が引き起こされていると考えることも可能である。それがどのような機構によっているのかは今後の解析が必要である。

本研究の結果は、SGT1 と RARI が壊死のみならずウイルス蓄積量の抑制に関与していることを示している。しかし、ウイルス蓄積量の抑制と壊死との因果関係は明らかとなっておらず、また PIAMV 感染の初期以降の段階における細胞死がウイルス蓄積量の抑制にどの程度寄与しているか、あるいはまったく寄与していないのかは不明である。一方で、R タンパク質依存的な抵抗性における HR においても、細胞死がどの程度抵抗性に関与しているかは詳細にはわかっておらず (Greenberg and Yao, 2004)、全身壊死におけるウイルス蓄積量の抑制と壊死との関係についても興味を持たれる。今後、壊死がどの程度ウイルス蓄積量の抑制に寄与しているかを解明するためには、壊死のみに関与しウイルス蓄積量の抑制には関与しない宿主因子などを見いだすことが重要であると考えられる。そのような因子を見いだせば、全身壊死における植物側のウイルスへの防御反応について新たな知見が得られるものと考えられる。

4. PIAMV による壊死のエリシターの解析

前章において、PIAMV 感染により「感受性」植物である *N. benthamiana* に引き起こされる全身壊死に、「抵抗性」の植物が示す反応として知られている SGT1、RAR1 を介した HR の誘導カスケードが関与していることが明らかになった。このことから、HR の場合と同様に、PIAMV 感染による全身壊死においても、個々の細胞の壊死を誘導する「エリシター」が PIAMV に存在する可能性が考えられた。

これまで、抵抗性の植物に HR を引き起こすエリシターの同定は、アグロインフィルトレーションでウイルスの各タンパク質を一過的に発現させる手法などにより行われてきた。一方、ウイルス感染により「感受性」植物に引き起こされる全身壊死は、植物細胞内においてウイルスが大量に蓄積することにより非特異的に誘導されると考えられてきたものの、PIAMV 感染により *N. benthamiana* に引き起こされる全身壊死においては、PIAMV のウイルス RNA の蓄積量は壊死とは必ずしも関連がなかった (Ozeki *et al.*, 2006)。しかしながら、PIAMV がコードする特定のタンパク質がエリシターとして機能するかは確かめられていない。

そこで本章では、PIAMV のコードするタンパク質に、そのみの発現で壊死を誘導するエリシターが存在するか、また存在する場合、そのウイルス因子は何か、について解析することとした。

4.1. 材料と方法

4.1.1 各種 PIAMV 変異ウイルスの構築

DNA のゲル精製、ligation、大腸菌への形質転換などは、特に断りのない限り、第 2 章 2.1.3. 節の「防御関連遺伝子の発現解析」と同様の方法で行った。

TGB、CP 変異 PIAMV の構築

本研究で用いた全てのコンストラクトは、PIAMV-Li1 の全長 cDNA を 35S プロモーターと nos ターミネーターの間に挿入した pCAMBIA1301 ベースのベクターである pLi1 を基に作製した（第 2 章 2.1.1 節参照）。

Li1-ΔTGB1 および Li1-ΔTGB2 の構築には、それぞれ LidelTG1F (5'- CCT TAA CTC CGA TTA ACA CGG ACA TAG TCA TCT CAG CCC -3') と LidelTG1R (5'- GGG CTG AGA TGA CTA TGT CCG TGT TAA TCG GAG TTA AGG -3')、および LidelTG2F (5'- CAC CGA GCC CAA CTA CAC GTC CGG AGC CCA CCA CCT C -3') と LidelTG2R (5'- GAG GTG GTG GGC TCC GGA CGT GTA GTT GGG CTC GGT G -3') という complement なプライマーセットを 2 組用いた (ATG を ACG に変異させた開始コドンは下線で示してある)。pLi1 を鋳型として、2606F と LidelTG1R (あるいは LidelTG2R)、LidelTG1F (あるいは LidelTG2F) と poly(dT) のプライマーの組み合わせでそれぞれ KOD-Plus DNA polymerase (TOYOBO) で増幅した。PCR は伸長反応 (72°C) を 3min、また 30cycle で行った。2606F と LidelTG1R (LidelTG2R) により増幅すると RdRp の ORF の 3'末端から TGB1 (TGB2) の 5'末端までに相当する DNA 断片が得られる。一方 LidelTG1F (LidelTG2F) と poly(dT) により増幅すると TGB1 (TGB2) の 5'末端から PIAMV ゲノムの 3'末端までに相当する DNA 断片が得られる。それぞれの増幅断片をゲル精製後、二つの増幅断片を混合して同時に鋳型として、2606F と poly(dT) を用いて recombinant PCR を行なった。本 PCR は、伸長反応 4min、30cycle で行った。これにより、RdRp の ORF の 3'末端から PIAMV ゲノムの 3'末端までに相当する DNA 断片が得られた。断片はタンパク質除去処理、Suprec02 によるプライマー除去処理後、*Bgl* II (nt 3212)、*Spe* I (nt 5981) で切断し、同じ制限酵素により切断した pLi1 に導入した。

Li1-ΔTGB1 および Li1-ΔTGB2 は、それぞれ TGB1、TGB2 の開始コドンに変異 (M→T) を持っており、それぞれのタンパク質を発現しないコンストラクトである。なお、Li1-ΔTGB2 における TGB2 の開始コドンの変異は、オーバーラップする TGB1 のアミノ酸配列を変化させない。

pLi1 にはその pCAMBIA1301 のベクター部分に *NotI* サイトが存在する。そこで Li1-ΔTGB3 を構築するために、まず pLi1 を *BglII* と *SpeI* で切り出した約 2800 塩基の断片をジャガイモ X ウイルス (*Potato virus X*; PVX) をベースにしたウイルスベクターである pP2C2S (Sainsbury Laboratory の David Baulcombe 博士より譲渡いただいた) を同じ制限酵素サイトで切断したベクターにサブクローニングし、cBgSpLi1 を構築した。これを *NotI* (nt 5172) で切断後、Klenow Fragment (TaKaRa) で処理し平滑化したのち、セルフライゲーションさせた。狙い通りに *NotI* がつぶれたクローンの *BglII* から *SpeI* までの DNA 断片を pLi1 に戻し、Li1-ΔTGB3 とした。

Li1-ΔTGB3 は、PIAMV ゲノムの nt 5172 における *NotI* 切断により生じた 5'突出末端を Klenow Fragment により平滑化したことにより 4bp の挿入が生じている。この変異は TGBp3 の 52 番目のアミノ酸からフレームシフトを起こさせており、67 番目のアミノ酸に終止コドンを生じているため、TGBp3 の C 末の 55 アミノ酸が欠失している。また、TGBp3 にコード領域がオーバーラップする TGBp2 も、98 番目のアミノ酸からフレームシフトが起こっている。このため 108 番目のアミノ酸に終止コドンを生じ、3'末端が 9bp 短くなり、C 末の 3 アミノ酸の欠失 (C 末 13 アミノ酸の変異) が生じている。しかしこの TGBp2 の C 末端の 13 アミノ酸の領域は比較的保存性が低く、また TGBp2 の機能に重要な膜貫通ドメインの外側にあるため、TGBp2 の機能には大きな影響を及ぼさないものと考えられた。

PIAMV の CP の ORF の 5'末端には、同一フレーム内に 2 つの AUG コドンが存在しており、これは PIAMV-Li 分離株でも保存されている。PIAMV ロシア分離株の *in vitro* 翻訳解析では 5'側の AUG コドンから翻訳開始していると報告されているが (Solovyev *et al.*, 1994)、PIAMV-Li 分離株において 2 つの AUG コドンがどのような役割を果たしているかは明らかではない。そこで、PIAMV-Li1 の CP の 2 つの AUG コドン (nt 5362-5364, nt 5404-5406) に変異を入れるため、Plmut-5354F (5'- TCT CCA CCA CGG CAC TCA A -3') と Plmut-5372R (5'- TTG AGT GCC GTG GTG GAG A -3')、および Plmut-5396F (5'- TCA ACG CGG CGA

CCT TCG -3') と PImut-5414R (5'- CGA AGG TCG CCG CGT TGA -3') という complement なプライマーセットを2組設計した(AUG コドンに入れた変異は下線で示してある)。pLi1 を鋳型として 2606F と PImut-5372R をプライマーとして PCR 増幅して得た RdRp の ORF の 3'末端から CP の ORF の 5'末端までに相当する DNA 断片と、PImut-5354F と poly(dT)をプライマーとして PCR 増幅して得た CP の ORF の 5'末端から PIAMV ゲノムの 3'末端までに相当する DNA 断片を、ともにゲル精製した後 recombinant PCR で結合させた。結果として得られた RdRp の ORF の 3'末端から PIAMV ゲノムの 3'末端までに相当する DNA 断片を *Bgl* II、*Spe* I で切断し、同じ酵素で切断した pLi1 に導入して Li1-ΔCPN を得た。次いで、この Li1-ΔCPN を鋳型として、PImut-5396F と PImut-5414R を用いた同様の2段階の PCR により2つめの AUG コドンにも変異を導入し、Li1-ΔCP を得た。

RdRp 単独発現変異ウイルスの構築

RdRp が壊死誘導のエリシターであるかどうかを、53U-RdRp1、5U-RdRp1、5U-RdRp1-fs の3種の RdRp 単独発現変異ウイルスを構築して解析した。以下にその構築法を示す。

53U-RdRp1 は、TGB と CP を欠失し、RdRp のみを PIAMV の両 UTR の間にコードする変異ウイルスである。Li-2032F (5'- GCA GAC CAA CCT CGC CAT CT -3') と LiRD-R (5'- ATT TGA TAT CTT AGT CGA CAT CGG AGT TAA GGA AAG ATG AAC CAC C -3') の両プライマーを用いて pLi1 を鋳型に PCR を行い、RdRp の後半部分、約 2100bp の DNA 断片を増幅した。この断片を *Bgl* II で切断したインサート(片側は KOD DNA polymerase により増幅したままの平滑末端になっている)を、pLi1 を *Spe* I 切断後 Klenow Fragment により平滑化、さらに *Bgl* II で切断したベクターに ligation した。

5U-RdRp1 は、53U-RdRp1 からウイルスゲノムの複製に重要であると考えられる 3'UTR を除いた変異ウイルスである。35SXbEcf (5'- TAT TCT AGA GAA TTC AAA CCT CCT CGG ATT CCA TTG -3') と LiRD-R (5'- ATT TGA TAT CTT AGT CGA CAT CGG AGT TAA GGA AAG ATG AAC CAC C -3') の両プライマーを用いて pLi1 を鋳型に PCR を行い、35S プロモーター、5'UTR、RdRp の全長を含む約 4500bp の DNA 断片を増幅した。この断片を 35S プロモーター前にある *Xba* I で切断(RdRp の後ろ側は 53U-RdRp1 と同様に KOD DNA polymerase により増幅したままの平滑末端)し、pCAMBIA1301 を *Xba* I と *Pma*C I で切断したベクターに ligation した。

5U-RdRp1-fs は、5U-RdRp1 の N 末領域にフレームシフト変異を導入し、RdRp のほぼ全領域のタンパク質を発現しない変異ウイルスである。5U-RdRp1 を *Mun* I で切断後、タンパク質除去を行い、Klenow Fragment により平滑化し、セルフライゲーションさせた。フレームシフト変異をシーケンスで確認し、5U-RdRp1-fs とした。この変異は RdRp の 75 番目のアミノ酸からフレームシフトを起こさせており、76 番目のアミノ酸に終止コドンを生じている。

4.1.2 RdRp の大量発現、精製、抗体作製

RdRp 大量発現系の構築

RdRp をコードする ORF1 の一部を PCR 増幅し、大腸菌の発現ベクターに組み込んだ。大腸菌での遺伝子発現系として、目的タンパク質に 6 個のヒスチジン残基のタグ (His-tag) を付加して発現する pET30a (+) vector (Novagen) を用いた。本ベクターにより、目的タンパク質の C 末端もしくは N 末端に His-tag を付加したタンパク質の発現が可能である。pET システムは転写活性の高い T7 ファージ由来の RNA Polymerase を利用しており、目的タンパク質の高発現に適している。この系においては、挿入した遺伝子上流にある T7 RNA Polymerase のプロモーター部位がラクトースリプレッサーにより制御されており、さらに大腸菌ゲノムに組み込まれた T7 RNA Polymerase 遺伝子上流にあるプロモーター部位も同様にラクトースリプレッサーにより制御されている。これを利用して IPTG 添加により両リプレッサーが解離し、まずゲノムに組み込まれている T7 RNA Polymerase 遺伝子の発現が誘導される。続いてこの T7 RNA Polymerase が目的遺伝子上流にある T7 Promoter 部位に結合して目的遺伝子の発現を誘導する、という 2 段階のシステムである。これにより IPTG による目的遺伝子の高発現が期待できるだけでなく、非誘導時の基底レベルでの発現を低く抑えられるという特徴がある。

宿主となる大腸菌の菌株としては、ゲノムに T7 RNA Polymerase 遺伝子が組み込まれており、かつプロテアーゼ遺伝子を欠損していることからタンパク質の発現系に適した BL21 (DE3) 株を用いた。具体的な方法は、以下の通りである。

1. PIAMV-Lil 分離株の RdRp をコードする ORF1 の一部を増幅するプライマーセット

(LiMD-F: 5'- ATT TGA TAT CGA ATT CCA TAT GTC AAA CGT TCG GAA CGT CTT C -3',
および、LiMD-R2: 5'- TAA AGA TAT CGT CGA CGA TCT CGG ATG GCT GGT AAT G -3')
を設計した。なお下線部は付加配列で、*Nde* I と *Sal* I の制限酵素サイトをそれぞれ含む。
この付加配列には、*Nde* I、*Sal* I 両サイトのほか、これらの酵素が効率よく切断されるよう
にそれぞれの認識サイトの外側に付加配列を兼ねた制限酵素サイトを付けた。加えて、*Nde*
I の認識サイトの外側には *EcoR* I と *EcoR* V の認識サイトを付加し、*Sal* I の認識サイトの
外側には *EcoR* V の認識サイトを、それぞれ同時に付加した。

2. PCRにより増幅したDNA断片をフェノクロ抽出、エタノール沈殿し、適量のTEで溶解した。
3. 増幅断片を *Nde* I と *Sal* I 両酵素により完全切断するように処理した。
4. 0.7% Agarose Gelで泳動後、EtBr染色しUVで可視化し、目的サイズのバンドをゲルより回収し、DNA断片をGene Clean III (BIO 101)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。
5. 同様に pET 30a vectorも *Nde* I と *Xho* I 両酵素により切断し、精製した。
6. 精製したインサートとベクターを TaKaRa ligation Kit Ver.2. Solution Iを用いて16°C、60分間ligationさせた。pET 30aベクターに *Nde* I & *Xho* I サイト (*Sal* I サイトは *Xho* I サイトと compatible end を形成している) を使って遺伝子を組み込むと、組み込んだ遺伝子産物のC末端に6残基のヒスチジンが付加するようになっている。
7. ligationしたDNAを用いて、大腸菌 BL21 (DE3) コンピテントセルを形質転換した。形質転換およびコンピテントセルの作製方法は、第2章2.1.2.節と同様である。
8. 形質転換された大腸菌を、LB / ampicillinプレート培地に散布して37°Cで1晩静置して多数のコロニーを得た。
9. いくつかのコロニーを選び、LB / ampicillin液体培地で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 *Nde* I および *Xho* I で切断し、insertを確認した。
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、pET 30a 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 T7 terminator primer (5'- GCT AGT TAT TGC TCA GCG G -3) を用いた。シーケンスの方法は、第2章2.1.3.節と同様である。

12. 目的の配列が挿入されていたクローンを選び、次節の発現誘導に用いた。

RdRp の発現誘導と集菌

1. ORF1 の一部が挿入されている pET30a vector を持った BL21 株のコロニーを、LB / ampicillin 液体培地 5 ml に植え継ぎ、37°Cで一晩振盪培養した。(前培養)
2. 新しい 200 ml の LB / ampicillin 液体培地に、前培養した培養液を 2 ml 加え、37°Cで振盪培養した。(本培養)
3. O.D.₆₀₀ = 0.7 付近になるまで培養した後、IPTG を終濃度 1 mM になるように加えて部分長 RdRp の発現を誘導した。
4. 37°Cで振盪培養を継続し、その後 1 時間おきに 10 ml の培養液をサンプリングし、氷上で保存した。
5. IPTG 添加による発現誘導から 3 時間後、すべての培養液を回収し、氷水中に保持して冷却した。
6. 途中でサンプリングした培養液も含め、すべての培養液を 3,000×g、4°Cで 15 分間遠心した。
7. 上清を完全に除去し、沈殿 (大腸菌の菌体) を -20°Cで保存した。

RdRp の発現の確認

1. 集菌した部分長 RdRp 発現大腸菌を、10 ml の培養液あたり 0.4 ml の Binding buffer (500 mM NaCl、20 mM Tris-HCl、pH 7.9、5 mM imidazole) に懸濁した。
2. 氷上で超音波破碎した。
3. 破碎液を 12,000×g、4°C、15 分間遠心し、可溶性画分 (上清) と不溶性画分 (沈殿) に分離した。
4. 不溶性画分には 0.4 ml の Binding buffer を加え、再懸濁した。
5. 可溶性画分と不溶性画分ともに、4×SDS-PAGE sample buffer (0.2 M Tris-HCl、pH 6.8、8% SDS、24% β-mercaptoethanol、40% グリセロール、0.01-0.1% BromophenolBlue (BPB)) を 1/3 volume 加えて 1×とした。
6. 95°Cで 5 分間熱変性を行い、得られたサンプルを SDS-PAGE に供した。

SDS- polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE ミニゲル 1 レーンあたり 20 μ l の調製サンプルをロードした。SDS-PAGE は、Laemmli の方法に従い (Laemmli, 1970)、8.0 % T (w/v) 2.7 % C ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。T および C は Laemmli の方法によるアクリルアミドの濃度の表記方法であり、それぞれ、全量に対するポリアクリルアミドの含量 (w/v)、およびアクリルアミドモノマーに対するビスアクリルアミドの含量 (w/w) を示すが、通常は C を省略することが多いため、本論文においても以降は C を省略する。アクリルアミドゲルの作製にはミニスラブゲル作成キット (ATTO) を使用し、ゲル組成は以下の通りである。

Running ゲル : 8 % ポリアクリルアミド、373 mM Tris-HCl (pH 8.8)、0.1 % SDS

Stacking ゲル : 4.5 % ポリアクリルアミド、124 mM Tris-HCl (pH 6.8)、0.1 % SDS

ポリアクリルアミドは、予め作製しておいた 30 % アクリルアミド溶液 (0.8 % (w/v) *N,N'*-メチレンビスアクリルアミド、29.2 % (w/v) アクリルアミドモノマー) を使用した。これにより、2.7 % C のポリアクリルアミドゲルが作製できる。ゲル調製液を脱気した後に終濃度がそれぞれ 0.1 % となるように APS (ammonium persulfate) および TEMED (*N,N,N',N'*-tetramethyl- ethylenediamine) を加えアクリルアミドのラジカル重合を開始させ、ゲルを作製した。Running ゲルの重層には水飽和 1-ブタノールを使用した。

電気泳動には ATTO 製ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽を使用し、約 15-20 V/cm となるよう 25 mA/ゲルの固定電流で 70-90 分を行った。泳動時間の目安として、BPB (Bromophenol Blue) がゲルの陽極端に来る程度までとした。泳動バッファーとして 25 mM Tris、190 mM glycine、0.1 % SDS を用いた。

泳動後の染色は脱色が容易な CBB (Coomassie Brilliant Blue) 染色キットである Quick-CBB (Wako) を用いた。具体的な方法は以下の通りである。

Running ゲルを必要に応じてトリミング。

1. 50 ml の固定液 (50 % メタノール、10 % 酢酸) 中で、室温で 5 分間振盪した。2 回繰り返した。
2. QuickCBB の A 液 15 ml と B 液 15 ml とを混ぜ、室温で 30 分間振盪し染色を行った。

3. 染色後、ゲルを蒸留水で数回洗って脱色した。
4. 染色されたバンドを可視光下で撮影した。

RdRp の精製

部分長 RdRp を発現させた大腸菌より、His-tag が付加された RdRp を Ni^{2+} カラムによりアフィニティー精製した。この原理は、タンパク質に連続した数残基のヒスチジン残基があると、ニッケルイオンとキレート結合することを利用したものである。したがって、タンパク質の結合にはニッケルを結合できる樹脂 (His-bind resin、Novagen) を用いる。また、目的のタンパク質の溶出にはイミダゾール溶液を用いる。イミダゾールはヒスチジン残基の側鎖の構造と同じ物質であり、キレート結合の競合反応によって目的のタンパク質が溶出する。

前々節の“RdRp の発現の確認”において、発現している部分長 RdRp は不溶性画分に多く存在することが分かったため、以下の手順は不溶性画分からの精製法を行った。具体的な方法は以下の通りである。なお、これらの一連の精製操作は 2 ml/min の流速で行った。

1. 集めた菌体を、集菌前の培養液 200 ml あたり 20 ml の Binding Buffer (500 mM NaCl、20 mM Tris-HCl、pH 7.9、5 mM imidazole) に懸濁した。
2. 氷水上で超音波破碎した。
3. $12,000 \times g$ 、 4°C で 15 分間遠心し、可溶性画分 (上清) を捨て、不溶性画分 (沈殿) を得た。
4. 不溶性画分を 10 ml の Binding Buffer で再懸濁した。
5. $12,000 \times g$ 、 4°C で 15 分間遠心し、上清を捨て、不溶性画分を得た。
6. 不溶性画分に 6 M Urea を含む Binding Buffer を 5 ml 加え、よく懸濁した。
7. 4°C で 1 時間静置した。また、この段階のサンプルを 50 μl サンプルングし、 4°C に保存した。
8. 断面円 1.2 cm^2 、15 ml 容のカラム (Novagen) に、50 %スラリーの His-tag bind resin (Novagen) を 2 ml 入れ、カラムを作製した。樹脂の容量は 1 ml である。
9. 樹脂を樹脂容量の 3 倍量の滅菌水で洗浄した。
10. 樹脂容量の 5 倍量の Charge Buffer (50 mM NiSO_4) をカラムにアプライし、樹脂に

- ニッケルイオンを結合させた。ニッケルと結合した樹脂は鮮やかな青色を呈した。
11. 樹脂容量の3倍量の Binding Buffer (6 M Urea 入り) をアプライしてカラムを平衡化した。
 12. 平衡化したカラムに、7 で調整した不溶性画分のタンパク質溶液をアプライした。カラムへの結合量を増すため、素通り画分を再度カラムにアプライした。これを繰り返し、合計3回アプライした。また、この段階のサンプルを 50 μ l だけサンプリングし、4°Cに保存した。
 13. 樹脂容量の10倍量の Binding Buffer (6 M Urea 入り) をアプライしてカラムを洗浄した。この段階の溶出サンプルを 50 μ l だけサンプリングし、4°Cに保存した。
 14. 樹脂容量の6倍量の 6 M Urea 入り Wash Buffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 60 mM imidazole) をアプライしてカラムを洗浄した。この段階の溶出サンプルを 50 μ l だけサンプリングし、4°Cに保存した。
 15. 樹脂容量の6倍量の 6 M Urea 入り Elute Buffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 1 M imidazole) をアプライして His-tag が付加されたタンパク質を溶出した。
 16. 溶出された画分と、各段階でサンプリングしておいた画分を、それぞれ SDS-PAGE にかけてタンパク質の有無を検証した。SDS-PAGE の方法は、前節と同様である。

抗 RdRp 抗体の作出

精製した部分長 RdRp を用いて家兎を免疫し、抗血清を得た。兎は New Zealand rabbit を使用した。精製したタンパク質溶液を Freund's complete adjuvant (Difco) を用いて 1 : 1 の割合で乳化させ、兎に注射した。抗体の発現を上昇させるため、最初の注射から2週間後に2次注射を行い、さらにその2週間後、兎の血清を一部採取し、抗血清を得た。得られた抗血清はそのままウエスタンブロット解析に用いた。

4.1.3 *N. benthamiana* のペレット画分および可溶性画分の調製

N. benthamiana のペレット画分と可溶性画分の調製は、下記の方法で行った。

1. PIAMV、または pCAMBIA1301 (コントロール) をアグロインフィルトレーション接

種した *N. benthamiana* から、その接種領域の葉をサンプリングした。

2. 0.4 g の葉を液体窒素で粉状になるまで摩砕した。
3. 凍結した状態で抽出バッファー (50 mM Tris-HCl pH7.5、15 mM MgCl₂、120 mM KCl、0.1% 2-mercaptoethanol、20% glycerol および protease inhibitor cocktail (Complete: Roche)) を 550 µl 加えて溶解した。
4. 1,000×g、4°C で 20 分間遠心し、沈澱した植物の残渣を除いた。
5. 上清を 30,000×g、4°C で 30 分間超遠心し、上清を可溶性画分とした。
6. 沈澱に 150µl の抽出バッファーを加え溶解し、これをペレット画分とした。
7. ウェスタンブロット解析に使用した。

4.1.4 ウェスタンブロッティング

感染植物内における RdRp の発現を解析するため、4.1.3.節で PIAMV 感染および非感染の *N. benthamiana* 組織から抽出したタンパク質に対して、作製した抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。ウェスタンブロット解析に先立つ SDS-PAGE は、4.1.2.節と同様に行った。分子マーカーとして、Prestained Protein Marker, Broad Range (NEB) を用いた。ウェスタンブロット解析は、既報の方法 (Sambrook *et al.*, 1989) に従った。サンプルは高分子量のタンパク質を含んでいたため、ブロッティングはウェット式で行った。ウェスタンブロット解析の具体的な方法は以下の通りである。

1. SDS-PAGE 後の泳動ゲルを、Blotting Buffer (100 mM Tris、192 mM Glycine、20% (v/v) Methanol) に浸す。
2. SDS-PAGE の泳動ゲルと同様の大きさに切った厚手の濾紙を、同様に Blotting Buffer に浸す。
3. SDS-PAGE の泳動ゲルと同様の大きさに切った polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (Millipore) を、100% Methanol に 1 分ほど浸し、続いて Blotting Buffer に浸す。
4. ウェット式のブロッティング装置「ミニトランスブロットセル」(BIO-RAD) に、濾紙、メンブレン、ゲル、濾紙を重層する。
5. 電極を定電圧にセットし、100 V 60 分間のブロッティングを行った。

6. プロットティングの終わったメンブレンを Blocking Buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5、150 mM NaCl、0.1% (v/v) Tween20、5% (v/v) スキムミルク) にて室温で1時間振盪し、タンパク質がプロットティングされていないメンブレン表面をスキムミルクによりブロックした。
7. ブロッキング後のメンブレンを PBST (20 mM Tris-HCl, pH 7.5、150 mM NaCl、0.1% (v/v) Tween20) で軽くすすいだ。
8. 1次抗体溶液 (PBST に、2 μ l/ml 抗 RdRp 抗血清、および 0.5% (v/v) スキムミルクを加えたもの) にメンブレンを浸し、室温で1時間静置した。
9. メンブレンを PBST で3回洗った。
10. 2次抗体溶液 (2次抗体を PBST で 1/2,500 に希釈したもの) にメンブレンを浸し、室温で1時間静置した。2次抗体としては、アルカリフォスファターゼで標識された抗ウサギ IgG、ヤギ抗体 (Amersham Pharmacia Biotech) を用いた。
11. メンブレンを PBST で3回洗った。
12. メンブレンを AP バッファー (10 mM Tris-HCl, pH9.5、10 mM NaCl、1 mM MgCl₂) で洗った。
13. nitroblue tetrazolium および 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate-*p*-toluidine salts をそれぞれ AP バッファーに溶解させ、両者を混合しメンブレンに滴下した。
14. 暗黒下にて、バンドが目で確認できるまで静置した (1–10 分間ほど)。
15. 明確なバンドが得られたのち、蒸留水で入念にメンブレンを洗浄した。
16. スキャナーによりメンブレンの画像を取得した。

4.1.5 Co-infiltration 解析と RdRp の RNA の検出

Co-infiltration 解析

アグロインフィルトレーションは植物組織において、タンパク質の一過的な発現を可能にする方法として用いられるが、多量の mRNA がアグロバクテリウムの注入部位で転写されるため、一過的な発現の後に注入部位において RNA サイレncing が誘導されると考えられる (Johansen and Carrington, 2001)。実際、GFP 遺伝子をアグロインフィルトレーションにより発現させると、アグロインフィルトレーション 2、3 日後に GFP 蛍光はピーク

に達し、6日後にはほとんど蛍光が認められなくなる (Valli *et al.*, 2006)。p19 タンパク質は *Tombusvirus* にコードされる RNA サイレンシングのサプレッサーとして知られ、アグロインフィルトレーションの際に目的のタンパク質と同時に p19 を発現させることにより、タンパク質の一過的な発現量を上昇させる効果のあることが報告されている。この性質から、p19 はアグロインフィルトレーションにおいて利用されており、病原体がもつエリシターの壊死誘導実験にも用いられている (Voinnet *et al.*, 2003)。

そこで本章では、PIAMV の Lil 分離株がコードする各遺伝子に変異導入、もしくは RdRp のみを発現するようなバイナリーベクターを構築し、p19 もしくはコントロールとして pCAMBIA1301 をこれらのコンストラクトと共発現させることにより、それぞれの遺伝子産物の壊死誘導能を解析した。

Co-infiltration 解析は、別々のプラスミドを保持するアグロバクテリウムを混合して植物組織に注入するもので、二つ以上のコンストラクトを植物で共発現する際の簡便かつ有用な方法である (Johansen and Carrington, 2001)。Co-infiltration をするにあたって、infiltration 前に培養菌液を OD₆₀₀=1.0 となるようにアグロインフィルトレーションバッファーに再懸濁したアグロバクテリウムを等量ずつ混ぜ合わせた。アグロインフィルトレーションは第 2 章 2.1.1.節の「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」と同様の方法で行った。

RdRp のプラス鎖、マイナス鎖 RNA の検出

RdRp のプラス鎖およびマイナス鎖 RNA を検出するにあたって、DIG ラベル RNA プロブを転写するためのベクターを構築した。pLil を *Nde* I (nt 2526, 2619) と *Pst* I (nt 949, 3623) で切断し、nt 2619-3623 と思われる約 1000bp の RdRp コード領域の部分断片を同じ酵素で切断した pGEM-5Zf (+) ベクター (Promega) にクローニングした。第 2 章 2.1.3.節「防御関連遺伝子の発現解析」と同様の方法でインサートの入っていると考えられるプラスミドをシーケンスし、正しく RdRp コード領域がクローニングされたプラスミドを選び、その後カラム精製を行った。得られたプラスミドは、RdRp のプラス鎖を検出するプロブを作製する際は *Sac* I で切断し T7 RNA ポリメラーゼを用いて DIG ラベル RNA プロブの転写を行った。同様に、RdRp のマイナス鎖を検出するプロブを作製する際は *Spe* I で切断し、SP6 RNA ポリメラーゼを用いて転写を行った。

ノーザンブロット解析も第2章2.1.3節に従って行った。全RNAは6 μg を泳動、プロッティングし、検出には上記のプロープを用いた。

4.2. 結果

4.2.1 TGBp1-3,CPの壊死誘導能

PIAMV-Li1 分離株の *N. benthamiana* における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)。しかし、CP の N 末端を欠失した Li1 分離株変異体では接種領域の壊死が起こらなくなる (unpublished data) ことなどから、RdRp 以外のウイルス遺伝子の壊死への関与も否定できない。そこで次に、アグロインフィルトレーションと、アグロインフィルトレーションによる一過的なタンパク質の発現量を上昇させる p19 タンパク質の共発現の手法を用いて (Voinnet *et al.*, 2003)、Li1 分離株の RdRp 以外のウイルス遺伝子が発現しなくなるように変異を導入した各種の変異ウイルスの壊死誘導能について解析した。

構築した変異ウイルスは、Li1 の TGBp1-p3 がそれぞれ発現しないように変異を導入した Li1- Δ TGB1、Li1- Δ TGB2、Li1- Δ TGB3、および CP の N 末端領域、もしくは CP の全長タンパク質を発現しないように変異を導入した Li1- Δ CPN、Li1- Δ CP である。これら変異ウイルスを *N. benthamiana* にアグロインフィルトレーション法により接種したところ、いずれの変異ウイルスを接種した植物でも、接種 2 週間後に至っても非接種の上位葉において Li1 感染により引き起こされるような全身壊死病徴は観察されず、またこれら非接種上位葉から抽出した total RNA を用いた RT-PCR によっても、これら Li1 由来の変異ウイルスの RNA は検出されなかった。

また、接種領域では、図 4-1 のように、接種 6 日後までに Li1 の接種領域は壊死を示すのに対し (図 4-1 「Li1」)、Li1- Δ TGB1、Li1- Δ TGB2、Li1- Δ TGB3 はいずれも接種領域に壊死を示さなかった。また Li1- Δ CPN および Li1- Δ CP も、接種 6 日後に壊死が確認されたもののその壊死の程度は Li1 より弱かった(図 4-1)。

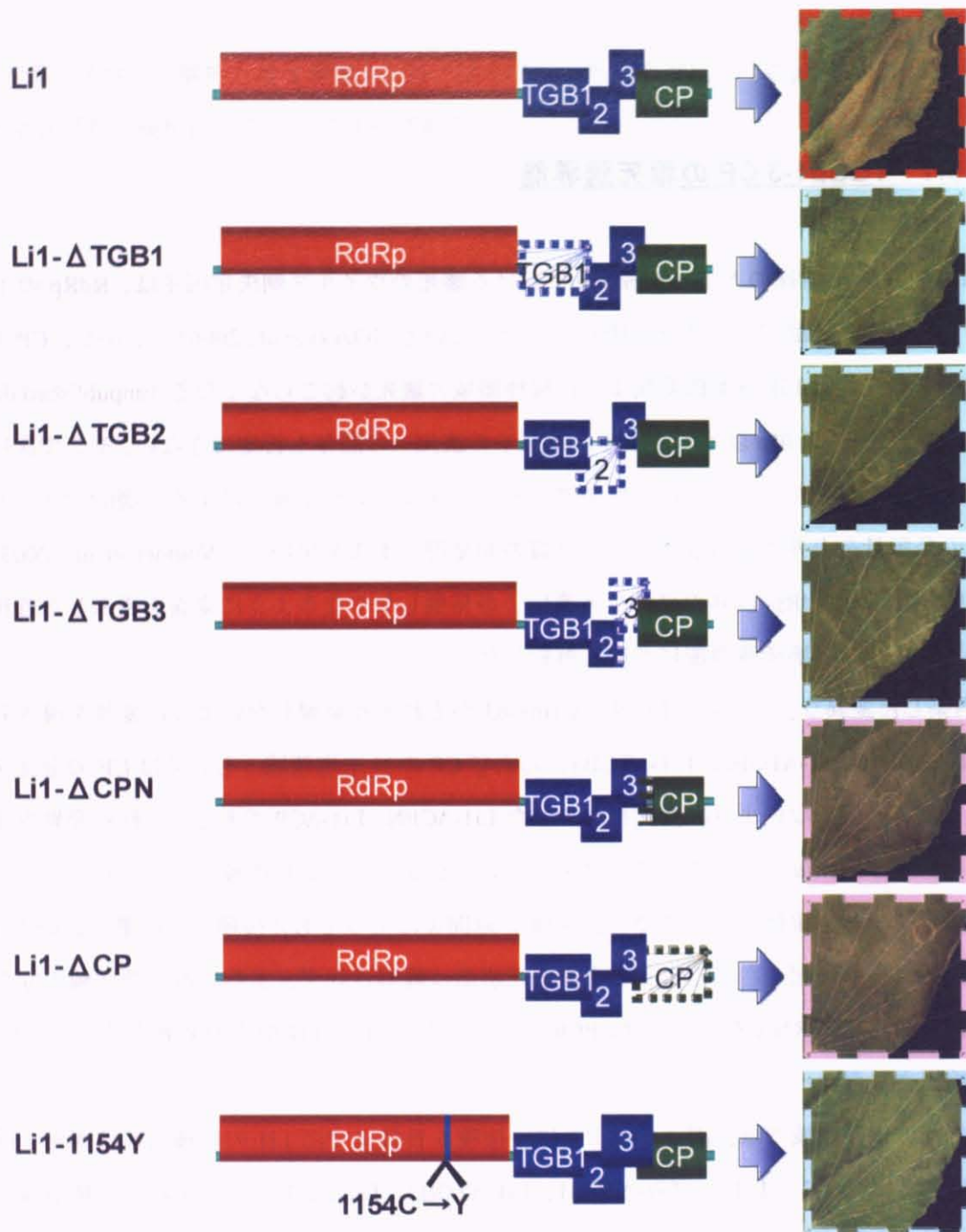


図4-1. Li1、Li1-1154Y、およびLi1のTGB1-3,CP変異体のゲノム構造とその壊死誘導能。右

は、これらの変異ウイルスをアグロインフィルトレーション法により接種した接種領域の写真。

赤の枠は壊死を、ピンク色の枠は弱い壊死を、水色の枠は無病徴を示す。

そこで、アグロインフィルトレーションによる一過的なタンパク質の発現量を増加させる p19 をこれらの変異ウイルスと共発現させたところ、Li1- Δ TGB1、Li1- Δ TGB2、Li1- Δ TGB3 のいずれの接種領域においても接種 6 日後までに完全な壊死が観察された (図 4-2 「Li1- Δ TGB1, Li1- Δ TGB2, Li1- Δ TGB3」)。また、Li1- Δ CPN および Li1- Δ CP の接種領域においても p19 と共発現させた場合に、Li1 の接種領域と同程度の強さの壊死が確認された (図 4-2 「Li1- Δ CPN, Li1- Δ CP」)。一方、壊死しない変異株である Li1-1154Y の接種領域においては p19 を共発現させたところ、壊死は観察されなかった (図 4-2 「Li1-1154Y」)。また、p19 を単独で発現させても接種領域には壊死が誘導されないことを確認した (図 4-2 「P19」)。

これらの結果から、TGBp1-3 および CP を欠失すると、壊死型の PIAMV による接種領域における壊死誘導が起こらなくなることが示された。

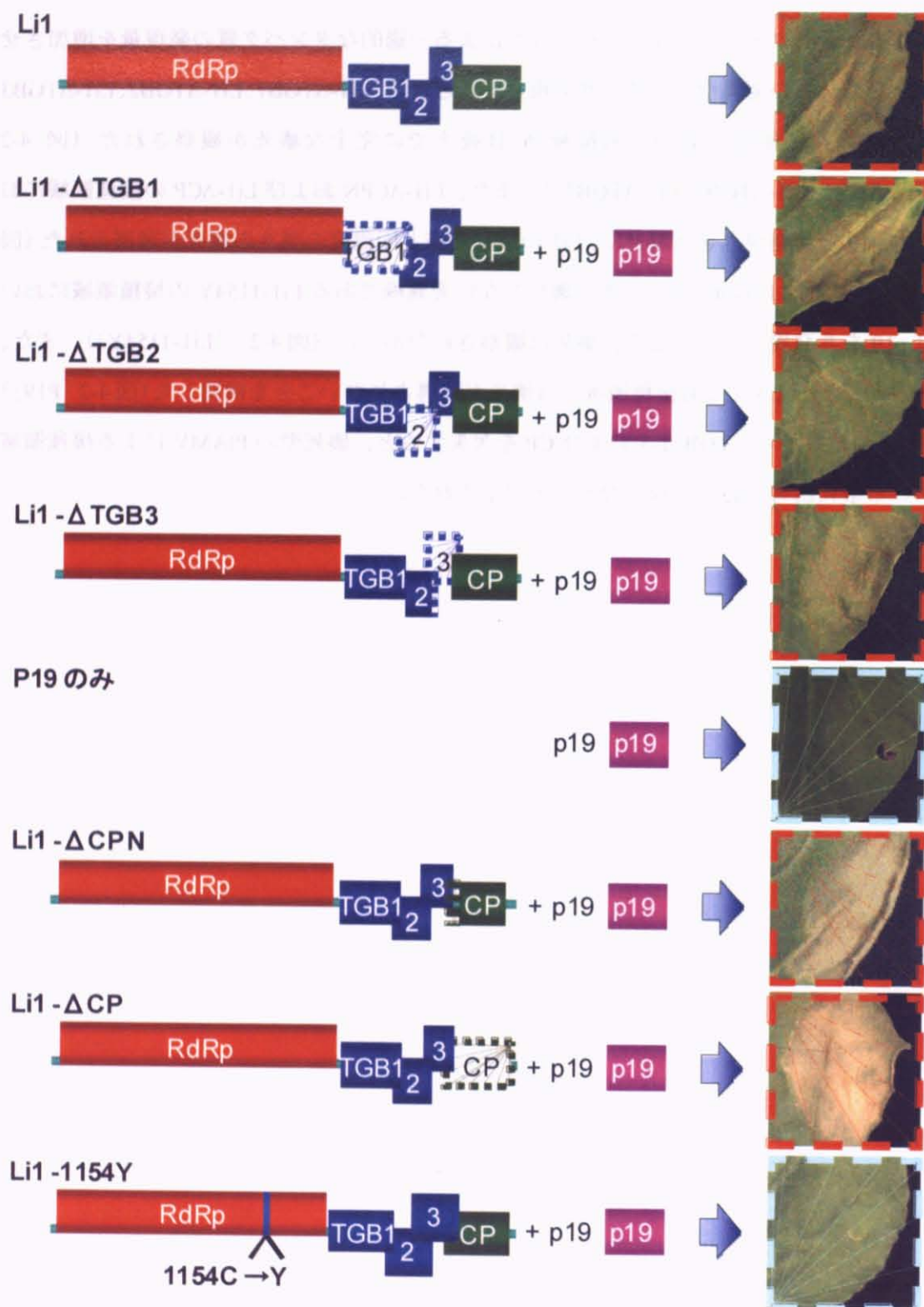


図4-2. *Li1*のTGB1-3変異体のゲノム構造とそのp19との共発現による壊死誘導能。写

真とその枠の色は、図「4-1」と同様。

4.2.2 PIAMV-RdRp の検出系の構築

RdRp 遺伝子の部分配列 (1005 bp、N 末の 335 aa コード領域) を大腸菌の発現ベクターである pET30a (+) にクローニングし、RdRp の C 末端に His-Tag を付けたタンパク質を大腸菌で大量発現させ、融合タンパク質をニッケルカラムにより精製した。その後、部分長 RdRp が、予測サイズ約 38.5 kDa の高純度タンパク質として精製されていることを SDS-PAGE によって確認した (図 4-3 「レーン 3」、矢頭)。この精製タンパク質試料を家兔に免疫し、抗 RdRp ポリクローナル抗体を作出した。この抗体が、大腸菌で発現させた部分長 RdRp と特異的に反応することを確認した。

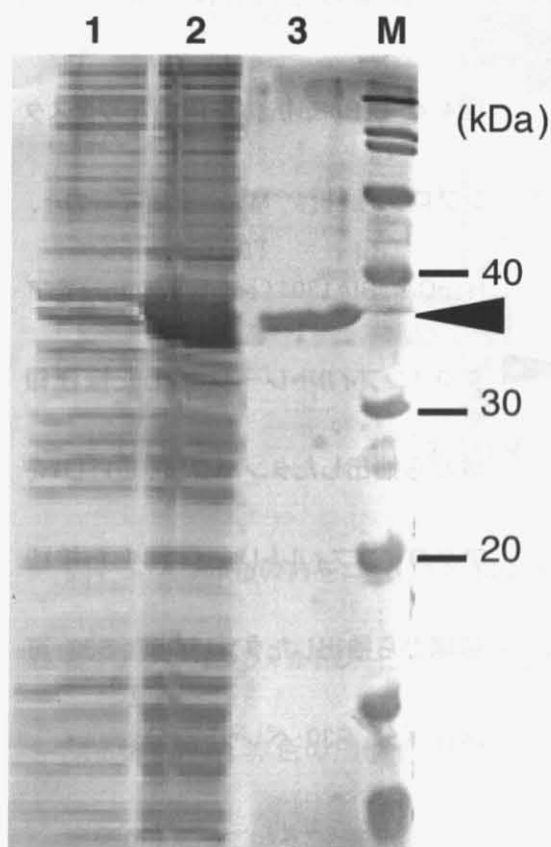


図4-3. 大腸菌で発現させ精製した部分長 Li1-RdRp の SDS-PAGE。1: 部分長 RdRp の発現誘導前の大腸菌のトータルタンパク質、2: IPTG により部分長 RdRp の発現を誘導した大腸菌の粗抽出画分、3: ニッケルカラムにより精製した部分長 RdRp、M: 分子量マーカー、矢頭: 部分長 RdRp の位置。

そこで、作製した抗体により PIAMV の感染時に発現する RdRp を検出できるかどうかを調べるため、PIAMV-Li1 分離株感染 *N. benthamiana* 植物組織から抽出したタンパク質に対してウェスタンブロット解析を行った。感染組織は PIAMV-Li1 接種領域を用いた。コントロールとして pCAMBIA1301 接種領域を用いた。両接種領域を磨砕し、超遠心によって分

画した。ペレットと上清画分のタンパク質を SDS-PAGE により分離、メンブレンに転写し作製した RdRp 抗体を用いたウェスタンブロット解析に供した。

その結果、PIAMV-Li1 感染 *N. benthamiana* のペレット画分 (P30) のレーンに特異的なバンドが確認された (図 4-4 「P30 Li1」、矢頭)。この分子量は、RdRp の全長の配列から推定される分子量 (156kDa) とほぼ一致した。一方、可溶性画分 (S30) においてはコントロールの pCAMBIA1301 接種領域から抽出したタンパク質と Li1 接種領域から抽出したタンパク質との間にバンドパターンの違いは認められず、PIAMV の RdRp と考えられる特異的なバンドは認められなかった。このウェスタンブロット解析の結果は、接種系をアグロインフィルトレーションから機械接種に変えても再現された。

このことから、作製した抗体により PIAMV 感染植物体内における PIAMV の RdRp を検出できることがわかった。

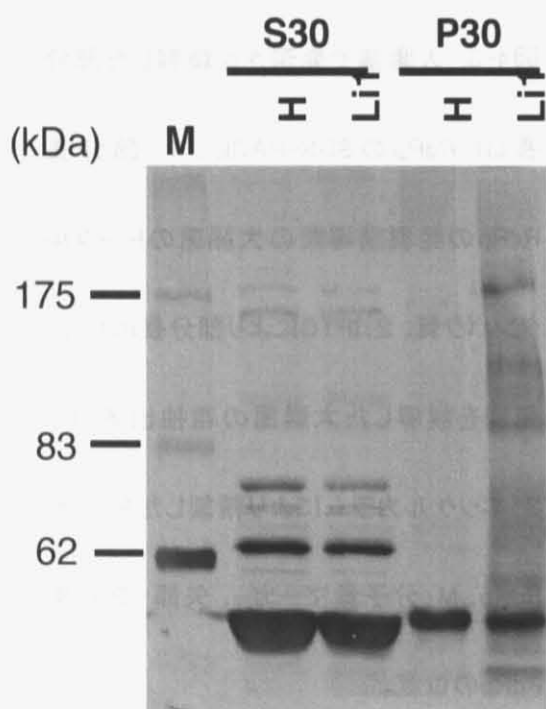


図4-4. 抗RdRp抗体を用いたウェスタンブロット解析。M:分子量マーカ、H:pCAMBIA1301(empty vector)をアグロインフィルトレーションした接種領域から抽出したタンパク質、Li1:Li1をアグロインフィルトレーションした接種領域から抽出したタンパク質。S30:可溶性画分、P30:ペレット画分。

4.2.3 RdRp の壊死誘導能

TGBp1-3 および CP のいずれも、PIAMV による接種領域の壊死を誘導する因子ではなかったことから、次にこれらの遺伝子を除去し、ゲノムの両端部分にある 5'UTR、3'UTR を持ち RdRp を発現する PIAMV 変異ウイルス 53U-RdRp1 を作製し、その壊死誘導能について調べた (図 4-5A)。その結果、本変異ウイルスは p19 を共発現せずとも、接種 3 日後に接種領域において壊死が観察された (図 4-5B)。

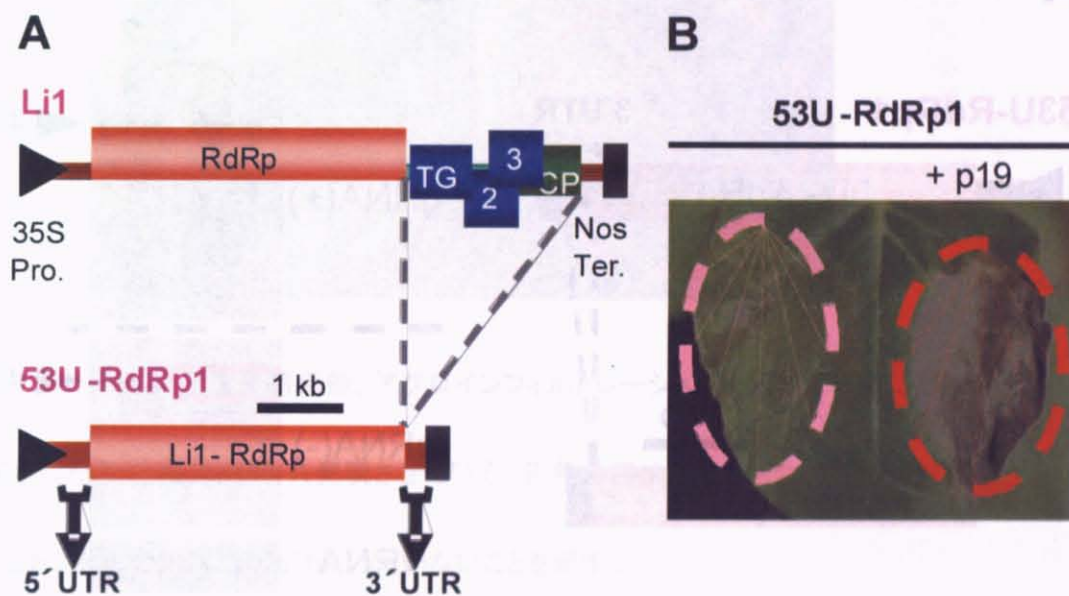


図4-5. A: RdRpのみをコードする53U-RdRp1のゲノム構造。B: 53U-RdRp1の壊死誘導能。アグロインフィルトレーション接種後4日における写真を示している。右はp19を共発現させている。赤色の円はその領域に壊死が起こっていることを、ピンク色の円は弱い壊死が起こっていることを示す。

しかし、この変異ウイルスには複製に重要な両 UTR が残っていることから、PIAMV の壊死がそのゲノム RNA の複製により誘導されている可能性を考え、次に 53U-RdRp1 からゲノム RNA の複製に重要であることが知られる 3'UTR を欠損した 5U-RdRp1 を構築した (図 4-6A)。まず、ノーザンブロット解析によって、これらの変異ウイルスからプラス鎖 RNA とともにウイルスの複製の際に生じるマイナス鎖 RNA の検出を試みた。その結果、

53U-RdRpI の接種領域からはプラス、マイナス鎖 RNA がともに約 4kb のバンドとして検出された。しかし、5U-RdRpI の接種領域からは 4kb のプラス鎖 RNA が検出されたもののマイナス鎖 RNA は検出されなかった (図 4-6B)。また、5U-RdRpI は p19 と共発現させてもマイナス鎖は検出されなかった (data not shown)。以上より、53U-RdRpI はそのゲノム RNA が複製可能であるが、5U-RdRpI は複製できないことが示唆された。

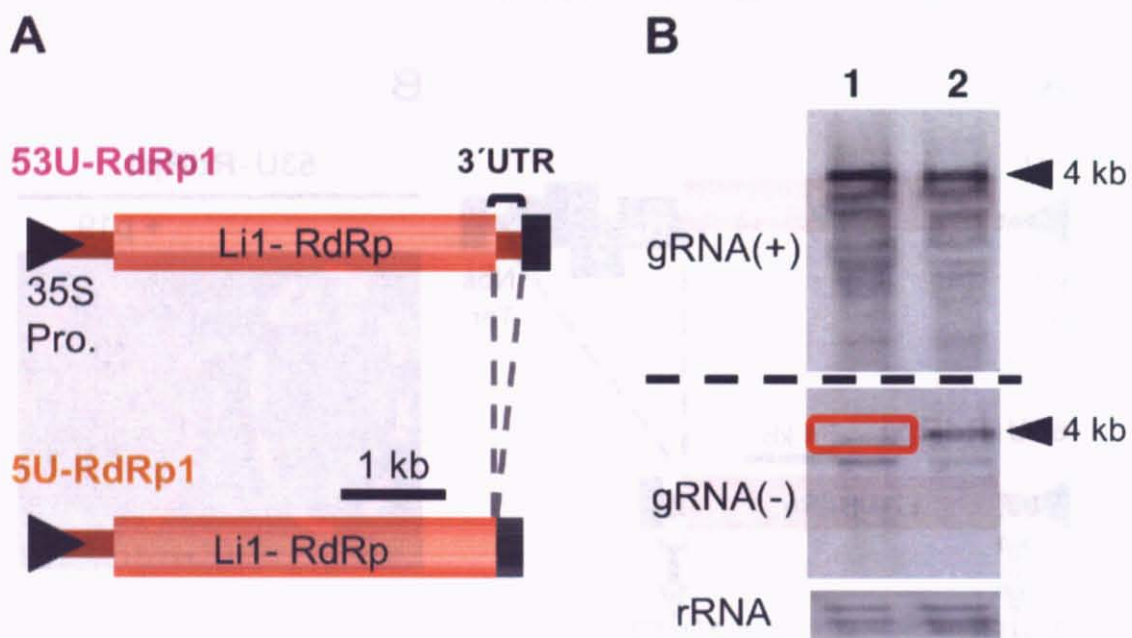


図4-6. A: 5U-RdRp1のゲノム構造。53U-RdRp1から3' UTRを削ったものが5U-RdRpである。

B: 53U-RdRp1および5U-RdRp1のプラス鎖RNA (gRNA(+)) およびマイナス鎖RNA (gRNA(-)) のノーザンブロット解析。1: 5U-RdRp1とp19を共発現させた接種領域、2: 53U-RdRp1の接種領域。いずれも接種3日後にRNAを抽出。gRNA(+))およびgRNA(-))の全長RNAの位置を矢頭で示した。

そこで、この複製できない 5U-RdRp1 の壊死誘導能を解析した。その結果、この変異ウイルスは接種 6 日後、p19 を共発現させた場合にのみ壊死を引き起こした (図 4-7)。このことから、壊死型の PIAMV による壊死の誘導にはゲノム RNA の複製は必要ないことが示唆された。

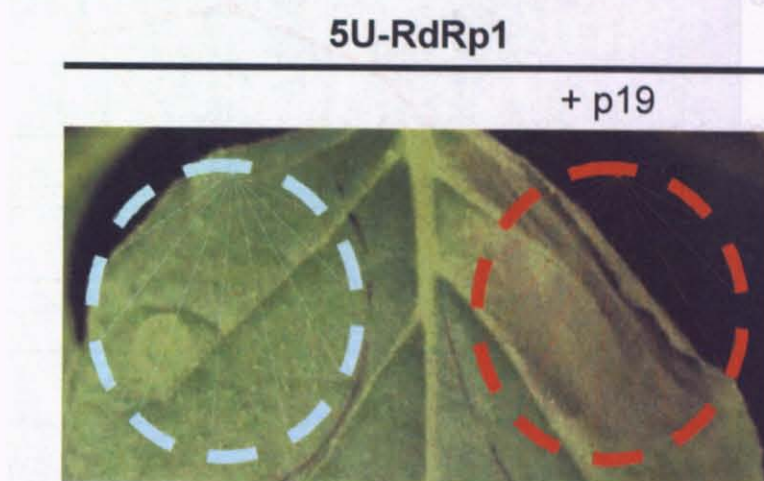


図4-7. 5U-RdRp1の壊死誘導能。アグロインフィルトレーション接種後6日後における写真を示している。右はp19を共発現させている。赤色の円はその領域に壊死が起こっていることを、水色の円は壊死が起こっていないことを示す。

また、複製しない 5U-RdRp1 の壊死誘導能と、先に解析した複製する 53U-RdRp1 の壊死誘導能を比較するため、両変異ウイルスの接種領域におけるイオンリーク解析を行った (図 4-8)。その結果、53U-RdRp1 は接種 2、3 日後から既にイオンリーク量が上昇し、接種領域は壊死を示した。これに対して、5U-RdRp1 は接種 2、3 日後において壊死を引き起こさないが、p19 を共発現させた条件ではイオンリーク量が上昇し接種 8 日後には 53U-RdRp1 と同程度の壊死を起こしていることが明らかになった。この結果は、PIAMV による壊死の誘導にそのゲノム RNA の複製が必要ではないことを定量的に示している。

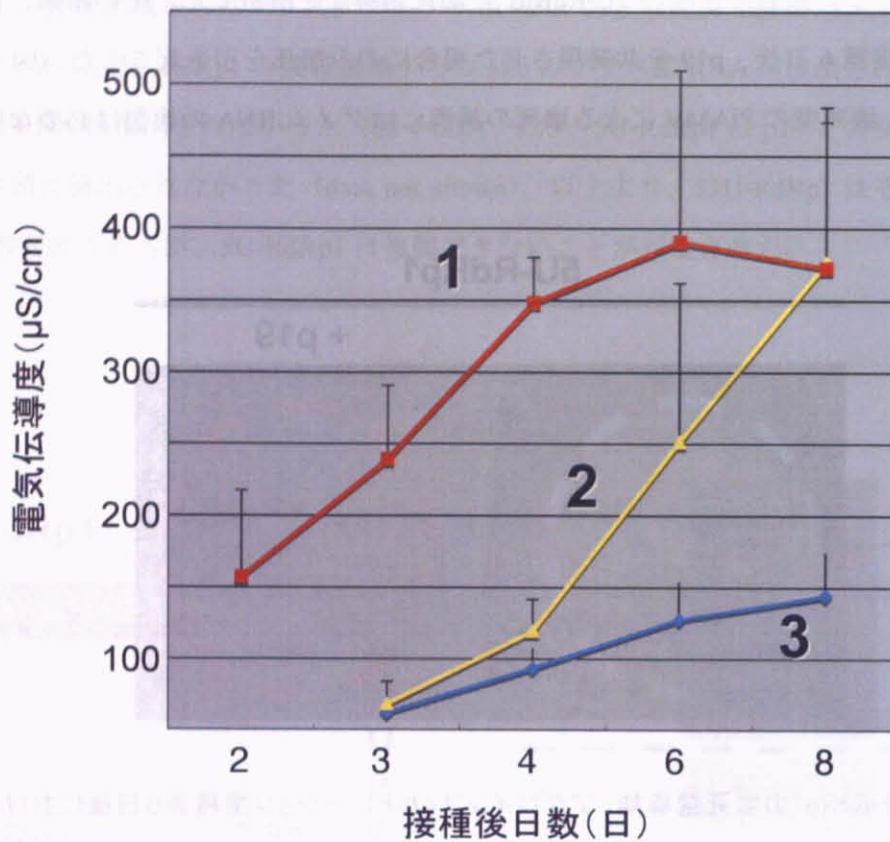


図 4-8. 53U-RdRp1 および 5U-RdRp1 のイオンリーク解析。1: 53U-RdRp1 (赤)、2: 5U-RdRp1 と p19 との共発現 (黄)、3: 5U-RdRp1 (青)、それぞれの接種領域の電気伝導度。

さらに RdRp コード領域の RNA が壊死の誘導に必要である可能性を考え、RdRp の N 末端にフレームシフト変異を導入し RdRp のほぼ全域を発現しない変異ウイルス 53U-RdRp1-fs を構築した。53U-RdRp1-fs の壊死誘導能を解析した結果、5U-RdRp1 の接種領域においては p19 と共発現させた場合に接種 6 日後に壊死を示すのに対して、53U-RdRp1-fs の接種領域においては p19 と共発現させた場合にも壊死は認められなかった (図 4-9)。このことから、RdRp コード領域の RNA も PIAMV による壊死の誘導には必要でないことが示された。

さらに、前節で作製した抗 PIAMV-RdRp 抗体を用いて、各種変異ウイルスの接種領域における RdRp の発現をウエスタンブロット解析で調べたところ、53U-RdRp1 ならびに 5U-RdRp1 の接種領域において RdRp が検出され、また両者とも p19 と共発現させた場合にはより多くの RdRp が検出された (図 4-10)。このことから、壊死の誘導が RdRp の発現量と相関していることが示唆された。

以上本章の結果をまとめると図 4-11 になる。このことから、PIAMV 感染によりその接種領域に引き起こされる壊死のエリシターが RdRp であることが明らかとなった。

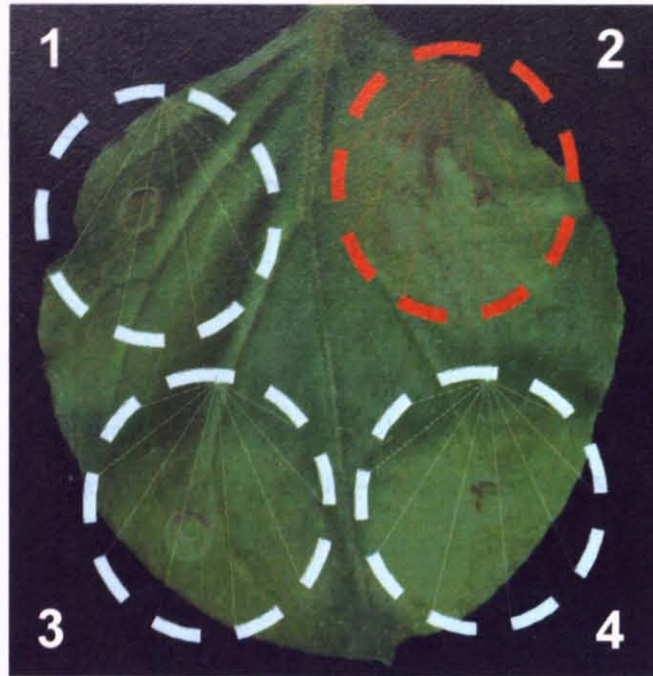


図4-9. RdRpコード領域のRNAの壊死への影響。アグロインフィルトレーション接種後6日の写真。1:5U-RdRp1のみ、2:5U-RdRp1とp19の共発現、3:53U-RdRp1-fsのみ、4:53U-RdRp1-fsとp19の共発現。円の色は、図4-7と同様。



図4-10. 各種RdRp発現変異ウイルスの接種4日後(レーン1のみ接種2日後)の接種領域からペレット画分を抽出し、抗RdRp抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。レーン1:53U-RdRp1、レーン2および3:5U-RdRp1、レーン4および5:53U-RdRp1-fs、レーン3および

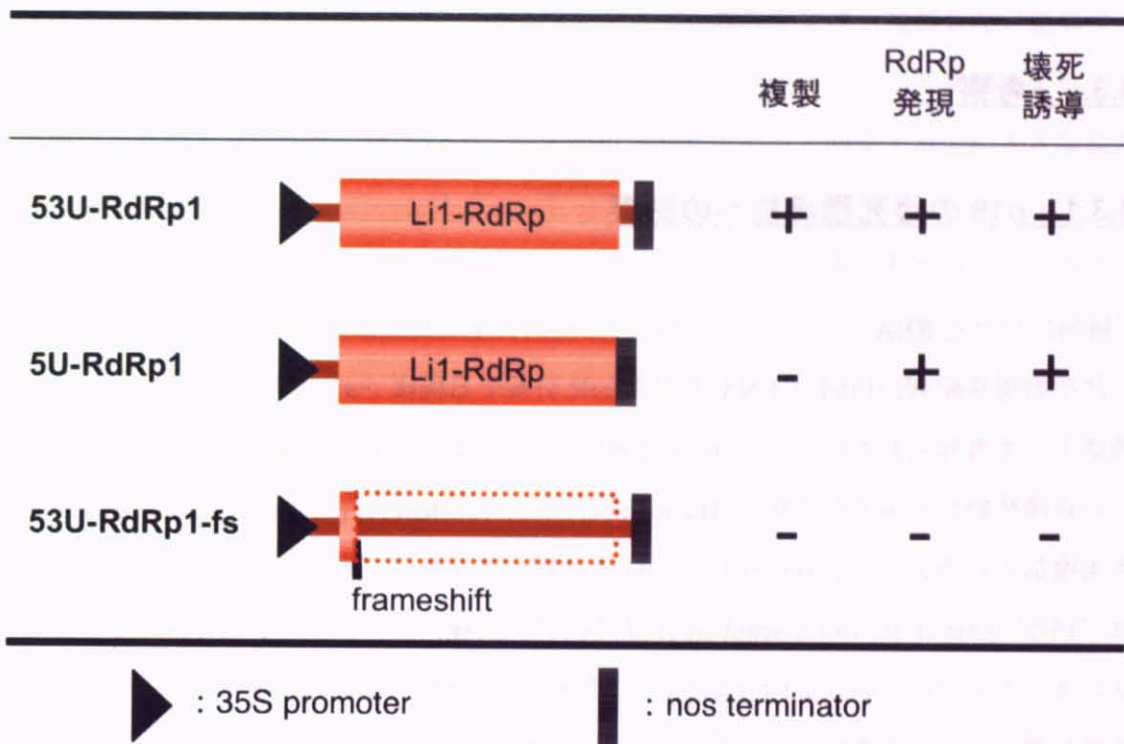


図4-11. 本章で構築したRdRp発現変異ウイルスのゲノム構造とその性質のまとめ。+は複製、RdRp発現が可能である(p19との共発現でゲノムマイナス鎖もしくはRdRpが検出できる)こと、および壊死を誘導しうることを示す。-は複製、RdRp発現ができない(p19との共発現でもゲノムマイナス鎖もしくはRdRpが検出できない)こと、および壊死を誘導しえないことを示す。

4.3. 考察

4.3.1 p19 の壊死誘導能への影響

植物における RNA サイレンシングは、細胞内に生じた二本鎖 RNA を認識・切断し、さらにその塩基配列に相同な RNA を特異的に分解する機構であり、ウイルスに対する防御機構としても知られている (Voinnet, 2001)。この、RNA interference としても知られる多くの真核生物に普遍的な現象は (Baulcombe, 2005; Vaucheret *et al.*, 2001)、植物においては、外来遺伝子を導入した形質転換体における過剰な外来遺伝子の発現抑制にも働くと報告されている (Que *et al.*, 1997; Schubert *et al.*, 2004)。同様に、アグロインフィルトレーション法による外来遺伝子の一過的な発現系においても、植物の RNA サイレンシングによりその発現量が抑えられているとの知見がある (Johansen and Carrington, 2001)。

p19 タンパク質は、*Tombusvirus* 属のウイルスにコードされる、植物ウイルスのもつ最も強力な RNA サイレンシングのサプレッサーの一つである (Voinnet *et al.*, 1999)。p19 は、RNA サイレンシングにおいて重要な働きを果たす 21-25 塩基の小分子 RNA である small interfering RNA (siRNA) に結合すると推測されており (Silhavy *et al.*, 2002)、実際、立体構造が決定された結果、二量体を形成することで siRNA と特異的に結合することが示された (Ye *et al.*, 2003)。この siRNA への結合能により、p19 は植物細胞のみならず動物細胞においても RNA サイレンシングを抑制する活性を持ち (Lecellier *et al.*, 2005)、RNA サイレンシングを研究するための非常に有益なツールとして用いられている。

この性質を利用して、アグロインフィルトレーションによる一過的なタンパク質発現の際に p19 を共発現させ、RNA サイレンシングを抑制することでタンパク質の発現量を増加させる手法が考案された (Voinnet *et al.*, 2003)。この手法は、GFP の一過的な発現量を増加させ GFP 蛍光を強められるだけでなく、HR を引き起こすエリシターの一過的発現による解析の際にも、エリシターの発現量を増加させることにより細胞死を強めることができる (Voinnet *et al.*, 2003)。多くの場合、エリシターの単独発現による細胞死はその量に依存して引き起こされるため (Bendahmane *et al.*, 1999; Van der Hoorn *et al.*, 2000)、p19 との共発現はエリシターの細胞死誘導能 (エリシター活性) を明瞭に観察する手段として用いることができる。実際に本研究では、TGBp1-3 や CP を発現しない変異ウイルス (Li1-Li1- Δ TGB1、

Lil- Δ TGB2、Lil- Δ TGB3、Lil- Δ CPN、Lil- Δ CP) や RdRp のみを発現し複製しない変異ウイルス (5U-RdRpI) は接種領域における壊死が観察されないが、p19 との共発現によって壊死が観察されるようになり、壊死のエリシターが RdRp であると同定するのに大きな役割を果たした。

また、p19 は *N. benthamiana* においては、そのみの一過的発現でも非特異的な壊死は起こらないことが示されている (Sarmiento *et al.*, 2006)。本研究でも、p19 のみの一過的発現によっては *N. benthamiana* に壊死は引き起こされなかつただけでなく、無病微型の Lil-1154Y を p19 と共発現させても壊死は全く認められなかった (図 4-2)。p19 による壊死が起こらないことは、本研究で p19 との共発現系により壊死のエリシターを解析することが適切であることを示している。以上より、5U-RdRpI などのコンストラクトを p19 とともに共発現させた際に認められる壊死は非特異的なものではなく、壊死型の PIAMV の RdRp がエリシターとなり特異的に起こった壊死であると考えられる。

しかしながら、RNA サイレンシングの強力なサプレッサーである p19 が、その接種領域において RNA サイレンシングが関与する他の現象に影響を与えている可能性も否定できない。例えば、RNA サイレンシングの機構のうち植物の内在性遺伝子の発現を制御する microRNA (miRNA) は、植物の発生 (Palatnik *et al.*, 2003) やストレス応答 (Fujii *et al.*, 2005)、花器官の形成 (Chen *et al.*, 2002) に関わるだけではなく、植物病原細菌に対する抵抗性機構の一環としてオーキシンのシグナル伝達系を制御していることも示されているなど (Navarro *et al.*, 2006)、内在性遺伝子の制御を通して多様な機能を持つことが知られている (Vaucheret, 2006)。p19 は siRNA に結合しその機能を阻害するだけでなく、miRNA の前駆体とも結合し内在性の遺伝子の発現制御機構を阻害することが示唆されている (Chapman *et al.*, 2004)。p19 は Lil-1154Y との共発現が壊死を誘導しないことから、本研究の結果には影響を与えないものの、p19 の共発現系においては miRNA による植物の内在性遺伝子の発現制御機構を撓乱している可能性を排除できない。

p19 の共発現以外に、アグロインフィルトレーション法による一過的なタンパク質の発現量を向上させる方法としては、高発現のプロモーターカセットを用いる方法がある。本研究で変異ウイルスの発現に用いているのはカリフラワーモザイクウイルス (*Cauliflower mosaic virus*; CaMV) の 35S プロモーターであるが、その配列はタンデムに重複させることで、下流からの遺伝子の発現を強めることができる。また、TMV の 5'UTR に存在する Ω

配列や植物のゲノム中のイントロン配列も下流の遺伝子の発現を強める効果があり、これらの配列を発現させたい遺伝子の upstream に組み込むことでタンパク質の発現量は著しく高まる (Mitsuhara *et al.*, 1996)。今後、RdRp の壊死誘導能に関して、高発現のプロモーターカセットを用いて p19 の共発現系の問題点を排除したうえで、同様の結果が再現されるかを確かめることにより、本研究の手法が適当であることがより明確になると考えられる。

4.3.2 TGBp1-3,CP は壊死のエリシターではない

PIAMV による壊死の誘導に TGBp1-3 および CP が必要であるかを調べるために構築した変異ウイルス (TGB 変異ウイルス: Li1- Δ TGB1, Li1- Δ TGB2, Li1- Δ TGB3, および CP 変異ウイルス: Li1- Δ CPN, Li1- Δ CP) は、接種後 2 週間後に至っても上葉で病徴が認められず、ウイルス RNA も検出されなかった (図 4-1)。これは、PIAMV の含まれる *Potexvirus* 属のウイルスが TGBp1-3 および CP をウイルスの細胞間移行に必要とする (Morozov and Solovyeu, 2003; Verchot-Lubicz, 2005) ことから、これらの変異ウイルスでは細胞間移行が起こらなくなり接種領域内に留まってしまうためと考えられる。

しかしこれらの TGB,CP 変異ウイルスも、その接種領域においては一様に感染し、変異導入した以外の遺伝子は発現していると考えられる。にもかかわらずこれらの変異ウイルスの接種領域における壊死が認められなかったのは、細胞間移行ができないために接種領域における変異ウイルスの蓄積量が低下し、それに伴い発現するエリシターの量が低下したためであると考えられる。実際、Li1- Δ TGB1,2,3, および Li1- Δ CPN, Δ CP はいずれも、接種領域におけるウイルス RNA 量が Li1 に比べ著しく低下していた (Ozeki, unpublished data)。

TGB、CP 変異ウイルスの接種領域において壊死を誘導するエリシターの量が低下している可能性は、p19 タンパク質を共発現させる実験によっても支持される。前節 (4.3.1.) で議論したように一過的なタンパク質の発現量を上昇させる p19 を共発現すると、いずれの変異ウイルスも接種領域において壊死を引き起こした。このことは TGB および CP 以外に、そのみで壊死を誘導するエリシター (ウイルス RNA もしくは RdRp) が PIAMV に存在している可能性を示唆している。

実際、後に 4.3.4 節で議論するように、RdRp が壊死のエリシターであることが示されたことから、TGBp1-3 や CP を欠損した変異ウイルスは、細胞間移行が不能になることでウイルスの接種領域の各細胞内における蓄積量、すなわち RdRp の蓄積量が減少したことに

より壊死を引き起こせなくなったものと解釈できる。

4.3.3 感染植物内における RdRp の発現解析

本研究では、PIAMV-Li1 分離株の部分長 RdRp に対する抗体を作出し、ウェスタンブロット解析によって感染植物組織における RdRp の検出を試みた。

これまでポテックスウイルス属のウイルスにおいては、大腸菌細胞内において RdRp を発現させる研究のほか (Li *et al.*, 1998)、植物体内から RdRp 画分を部分的に精製し、その画分における複製活性を検討する研究がおこなわれている (Doronin and Hemenway, 1996; Plante *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2001)。しかしながら、RdRp 抗体を用いることにより感染植物からポテックスウイルス RdRp を検出したのは本研究がはじめてである。本研究の RdRp 検出系においては、PIAMV 感染植物組織の 30,000 × g のペレット画分 (P30) で PIAMV の感染に特異的な RdRp と思われるバンドが検出されたが (図 4-4)、可溶性画分 (S30) および PIAMV 非接种植物からは特異的なバンドは見いだせなかった。ペレット画分に特異的に RdRp が検出されるというこの結果は、同じポテックスウイルスである PVX や *Bamboo mosaic virus* の感染植物組織における RdRp による複製活性がペレット画分に存在する、という既報の複製活性検定の結果と一致している (Doronin and Hemenway, 1996; Plante *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2001)。今後、本研究で検出したペレット画分における RdRp の複製活性について解析することにより、PIAMV 感染植物組織での RdRp の機能についての知見が深められるものと考えられる。

4.3.4 RdRp は壊死のエリシターである

全身壊死を引き起こすエリシターの解析はこれまでも行われているが、これらには、キメラウイルスを作製することにより全身壊死の病徴発現に関与するウイルス因子を決定した例や (Burgyan *et al.*, 2000; Diveki *et al.*, 2004)、ウイルスベクターを用いてウイルスタンパク質を発現させ、その病原性因子としての機能を見た例がある (Burgyan *et al.*, 2000)。しかし、全身壊死を引き起こすウイルスについてアグロインフィルトレーション法によりウイルスのタンパク質を単独で一過的に発現させ、壊死の誘導能を解析した研究は少ない。

本研究においては、全身壊死に伴う反応をアグロインフィルトレーションの接種領域で観察・解析することとした。本章においてもこの系を用いることにより、PIAMV の RdRp が壊死を誘導するエリクターとして機能しているという結果が得られた。つまり、第2章で示したようにウイルスが全身感染して誘導される全身壊死の病徴が、アグロインフィルトレーションにより接種領域に観察される病徴と常に一致して起こることに着目すると(2.2.1 および 2.3.1 を参照)、PIAMV は全身感染したのち、その感染組織で RdRp を多量に発現することにより壊死が誘導され、その結果植物体が全身壊死に至るものと考えられることができる。

本研究においては、複製する 53U-RdRp1 は単独でも壊死を誘導しうるが、5U-RdRp1 は p19 と共発現させた場合のみ壊死を引き起こす(図 4-11)。この現象は、53U-RdRp1 では、マイナス鎖 RNA を介した複製により RdRp を翻訳する鋳型であるプラス鎖 RNA が多量に合成されるため、複製しない 5U-RdRp1 と比較して RdRp が多量にかつ速やかに蓄積することによると考えられる。実際、53U-RdRp1 の壊死する直前の接種 2 日後における RdRp の発現レベルは、5U-RdRp1 を p19 と共発現させた場合での接種 4 日後に認められる RdRp の発現レベルと同程度である(図 4-10)。しかし、複製しうるものが RdRp の量に加えて相乗的に壊死の誘導に関与している可能性もあり、壊死を引き起こしうる RdRp の量については、時系列をとったウエスタンブロット解析などで詳細に調べていく必要がある。

4.3.5 UTR の有無と複製の壊死誘導能への影響

アグロインフィルトレーション法によるウイルスのタンパク質のエリクター活性の解析は典型的な HR を引き起こす植物-ウイルスの系でも行われており (Abbink *et al.*, 1998; Erickson *et al.*, 1999; Mestre *et al.*, 2000; Palanichelvam *et al.*, 2000)、その中には、RdRp がエリクターであった場合もある (Abbink *et al.*, 1998; Erickson *et al.*, 1999)。TMV は RdRp がタバコの *N* 遺伝子産物と相互作用し HR を引き起こす (Erickson *et al.*, 1999)。しかし、その全長 RdRp (183 kDa) は 5'UTR を付加しない場合、一過的発現による細胞死を誘導しない (Abbink *et al.*, 1998)。これは、5'UTR に存在する翻訳促進配列 (Ω 配列) がないと、RdRp の翻訳量が著しく低下するためであるとされている。さらに、3'UTR を TMV の RdRp に付加すると、細胞死はより激しく誘導されるが、この場合も PIAMV の 53U-RdRp1 と同様、TMV の複製が起きることで RdRp の量が増加していると考えられている (Erickson *et al.*,

1999)。この TMV-N の HR におけるエリシターである RdRp の解析より、RdRp のように分子量の大きなタンパク質のエリシター活性は、ウイルスゲノムの UTR を付加することでその発現量を上昇させ解析を容易できることが示唆される。

PIAMV と同属のポテックスウイルスにおいても 5'UTR が下流の遺伝子の翻訳を促進するという報告がある (Smirnyagina *et al.*, 1991; Pooggin and Skryabin, 1992; Zelenina *et al.*, 1992; Kim and Hemenway, 1996) ことから、本研究においても RdRp に常に 5'UTR を付加して実験を行った。本研究において、53U-RdRp1-fs は p19 との共発現によっても壊死を引き起こさないことから 5'UTR は壊死誘導に関与しないと考えられるものの、同じポテックスウイルスには 5'UTR に認められるステムループの 2 次構造がウイルスの病原性を決定する場合もある (鍵和田、2004)。こうした問題を解決するには、4.3.1 節で述べたような高発現のプロモーターカセットを用い、5'UTR を除いたうえで RdRp の壊死誘導能を解析する方法が考えられる。

また、本研究により PIAMV の複製やウイルス RNA の蓄積が壊死誘導には必要ではないことが示された。このことから、PIAMV の RdRp は宿主である *N. benthamiana* の細胞内に侵入した際に R タンパク質と直接的もしくは間接的に相互作用をすることにより壊死を誘導している可能性が示唆される。これに対して、壊死を誘導しない Li1-1154Y は Li1 と RdRp の 1 アミノ酸が異なるのみであるが、この 1 アミノ酸の変異により RdRp の立体構造が変化し、推定される R タンパク質との相互作用が変化するために壊死を誘導しえなくなっているものと考えられる。今後、Li1 以外の無病徴型の Li6, Li1-1154Y や壊死型の Li6-1154C について、RdRp の単独発現による壊死が誘導されるかどうかを解析することは興味深い。