

博士論文

ポティウイルス抵抗性植物の作出と解析

野村 研

目次

	ページ
第1章 緒言	1
第2章 植物ウイルスに見られる病原性の分化	5
第1節 BaMMVにおける新系統の発生	5
1. 緒言	5
2. 材料及び方法	6
(1) ウイルス分離株	6
(2) 汁液接種試験	6
(3) ウイルスの精製	6
(4) ELISA法による検出	7
3. 結果	7
(1) オオムギ品種の反応	7
(2) ウイルスの感染に及ぼす温度の影響	8
(3) ELISA法による検出	8
4. 考察	14
第2節 神奈川県で分離したTuMVの特性	16
1. 緒言	16
2. 材料及び方法	18
(1) ダイコン及びキャベツからのTuMVの分離	18
(2) TuMVの精製	18
(3) 外被タンパク質の電気泳動	18
(4) 血清反応試験	18
(5) RNAの抽出	19
(6) TuMV遺伝子のクローニングと塩基配列の決定	19
3. 結果	19
(1) 汁液接種試験	19
(2) TuMVの精製と電子顕微鏡による観察	22
(3) 血清反応試験	23
(4) TuMV分離株間における塩基配列の比較	24
4. 考察	25
第3章 TuMVゲノム由来の遺伝子を導入した形質転換植物の作出とTuMV抵抗性	26
1. 緒言	26
2. 材料及び方法	28
(1) TuMV遺伝子のクローニングとバイナリーベクターの構築	28

(2) シロイヌナズナ形質転換体の作出	30
(3) <i>N.benthamiana</i> 形質転換体の作出	30
(4) 汁液接種試験	30
(5) PCR	31
(6) RT-PCR	31
(7) サザンブロット解析	31
(8) ノーザンブロット解析	32
(9) ウェスタンブロット解析	32
(10) siRNA の検出	32
3. 結果	33
(1) シロイヌナズナ形質転換体の作出と TuMV 抵抗性	33
(2) シロイヌナズナ形質転換体の TuMV 分離株に対する反応	38
(3) TuMV-CP 遺伝子を導入した <i>N.benthamiana</i> の TuMV に対する反応	42
(4) NIb 及び VP g 遺伝子を導入した <i>N.benthamiana</i> の TuMV に対する反応	46
(5) サザンブロット解析	49
(6) 導入遺伝子の発現解析	52
(7) siRNA の検出	58
4. 考察	61
第 4 章 TuMV 抵抗性形質転換体の CMV 感染による抵抗性打破	65
第 1 節 神奈川県のとまとから分離した CMV の特性	66
1. 緒言	66
2. 材料及び方法	67
(1) 汁液接種試験	67
(2) ウェスタンブロット	67
(3) CMV 遺伝子のクローニングと塩基配列の決定	68
(4) サテライト RNA の検出	68
3. 結果及び考察	69
(1) CMV-KT の病原性	69
(2) CMV 系統間における CP 及び 2b 遺伝子の相同性	73
(3) サテライト RNA の検出	75
第 2 節 TuMV 抵抗性形質転換体の他のウイルス感染による RNA サイレンシング の抑制	76
1. 緒言	76
2. 材料及び方法	76
(1) 形質転換植物	76

(2) ウイルス	76
(3) ウイルスの検出	77
3. 結果	77
(1) CMV-KT のシロイヌナズナ形質転換体における RNA サイレンシングの抑制	77
(2) CMV-KT を接種したシロイヌナズナ形質転換体の TuMV に対する反応	80
(3) CMV、PVY 及び PVX を接種した <i>Nicotiana benthamiana</i> 形質転換体の TuMV に対する反応	84
(4) 1 次ウイルス接種後の <i>Nicotiana benthamiana</i> 形質転換体における CP-mRNA 及び siRNA の検出	88
4. 考察	90
第 5 章 総合考察	93
1. TuMV 抵抗性形質転換植物の特性	93
2. R 遺伝子による抵抗性と形質転換植物における抵抗性	95
3. RNA サイレンシング抑制と TuMV 抵抗性打破	96
4. 農業分野における応用の可能性	97
摘要	99
謝辞	103
引用文献	104

第1章 緒言

植物の病害には菌類、細菌、ウイルス、線虫などによるものがあり、農業生産上の大きな障害要因の一つとなっている。これらの病原体に対する主要な防除対策として、殺菌剤等の農薬の開発や、病害抵抗性品種の育成などによる防除技術の開発が進められてきた。しかし植物ウイルスに感染した農作物では一般に化学農薬による防除ができないことから、抵抗性品種の育成や、媒介昆虫などからの感染を防ぐための物理的防除や耕種の防除、土壌からの伝染を防ぐための薬剤等による土壌消毒などが行われている。また、病原性のないウイルスを前接種し、強毒ウイルスの感染を防ぐ弱毒ウイルスの利用がトマトモザイクウイルス (tomato mosaic virus, ToMV) など一部のウイルスで実用化されている (Nishiguchi and Kobayashi., 2011)。その中でも抵抗性品種を育成し、利用することは多くの植物ウイルスに対して最も効果的な防除法であり、より効果的な抵抗性品種の育成が求められている。

植物バイオテクノロジーの進展とともに遺伝子組換え技術が実用化され、1994年に日持ちの良いトマト「フレーバー・セーバー」がアメリカで市販されて以来、除草剤耐性、害虫抵抗性のダイズやトウモロコシ、花色を変えたカーネーションなど、様々な形質の遺伝子組換え農作物が開発され、日本では主に加工食品の原料として輸入・利用されるようになってきている。ウイルス抵抗性についても遺伝子組換え農作物の対象形質となっており、抵抗性品種を効率的に作出する技術開発が進められてきた。1986年、Beachyらはタバコモザイクウイルス (tobacco mosaic virus, TMV) の外被タンパク質 (CP) 遺伝子を導入したタバコに TMV を接種すると、対照の非形質転換タバコよりも病徴の発現が遅延し、ウイルス抵抗性を示すことを証明した (Powell et al., 1986)。この手法は多くの作物に応用され、多数の形質転換体を作製し、その中からウイルス抵抗性の強い個体を選抜することで目的とするウイルス抵抗性植物を作出する技術が確立された。その後、2種類のウイルスの CP 遺伝子を導入することで、複数のウイルスに対して抵抗性を示す事例が報告された (Lawson et al., 1990)。同様の方法で有用作物をウイルス抵抗性にする試みが世界各地で行われ、1994年にはパパイヤ輪点ウイルス (papaya ringspot virus, PRSV) の CP 遺伝子を導入したパパイヤが、また、1995年にはズッキーニ黄班モザイクウイルス (zucchini yellow mosaic virus, ZYMV)、カボチャモザイクウイルス 2 (watermelon mosaic virus2, WMV2) 及びキュウリモザイクウイルス (cucumber mosaic virus, CMV) の CP を組み込んだスクオッシュが開発されている (Tennant et al., 1994; Tricoli et al., 1995)。また、CP 遺伝子以外のウイルス遺伝子を導入した植物のウイルス抵抗性についても研究が進められ、*Bacillus thuringiensis* の殺虫性タンパク質 (Bt) 遺伝子とジャガイモ葉巻ウイルス (potato leafroll virus, PLRV) の複製酵素遺伝子を導入した PLRV 抵抗性ジャガイモなどが開発された (Thomas et al., 2000)。日本では、ウイルスの CP 遺伝子を導入した形質転換植物についてはイネ縞葉枯ウイルス (rice stripe virus, RSV) の CP を導入したイネ、CMV の CP を導入したトマト等で作出されている (斎藤ら, 2007)。このように植物ウイルスのような病原体由来の遺伝子を導入することで植物に与えられた抵抗性は pathogen-derived resistance (PDR) と呼ばれている (Stanford and Johnson, 1985)。

遺伝子組換え技術を利用したウイルス抵抗性植物の開発とともに抵抗性メカニズムの研究が進め

られた。TMV の CP 遺伝子を導入したタバコに見られるような病徴遅延型の抵抗性は、CP の発現レベルと抵抗性が一致することから CP の発現が必要であり、CP mediated resistance と呼ばれた。また、CP を発現した植物では TMV 粒子の感染に対しては抵抗性を示すが、RNA を接種した場合は抵抗性を示さないことから、導入遺伝子から翻訳された CP によってウイルスの脱外被が阻害されたと考えられた (Register and Beachy, 1988)。その後、tobacco etch virus (TEV) の CP 遺伝子を導入したタバコでは、CP を発現させた個体ではなく、逆に発現していない個体や、CP 遺伝子を非翻訳型あるいはアンチセンス型にし、CP に翻訳できないようにして遺伝子導入した個体がウイルス抵抗性を示す事が報告された (Lindbo and Dougherty, 1992)。その結果、導入した CP 遺伝子に由来する RNA のウイルス抵抗性への関与が推察され、RNA mediated resistance と呼ばれるようになった (Dougherty et al., 1994)。このような研究と並行し、種々の遺伝子を植物へ導入して発現させる試みが盛んになった。その中で、内在遺伝子の塩基配列と相同性のある遺伝子を導入すると、内在性遺伝子の発現が外来遺伝子とともに抑制される現象が発見され、コサプレッションまたはジーンサイレンシングと呼ばれた。ジーンサイレンシングは色素合成関連遺伝子であるカルコン合成酵素 (CHS) 遺伝子を導入したペチュニアから形質転換当代または次世代の中に、白い花色または青色がまばらになる花色の個体が現れる現象として発見された (Napoli et al., 1990; van der Krol et al., 1990)。ジーンサイレンシングを起こしている植物の特徴は、導入遺伝子から mRNA の転写はされているが、細胞質における蓄積量が少なく、ノーザンブロットによる発現解析を行うと mRNA が検出されないか、または検出レベルが極めて低いことなどである。その後の研究により、このような遺伝子の発現抑制は細胞質における mRNA の分解の結果であることが推察された (van Blokland et al., 1994; Jorgensen et al., 1996)。また、発現が抑制されている導入遺伝子や内在遺伝子からの転写は抑制されていないことが示され、転写後に起こる遺伝子の発現抑制という意味で post transcriptional gene silencing (PTGS) という用語が用いられるようになった。さらに RNA mediated resistance を示す形質転換植物におけるウイルス抵抗性には PTGS が関与していると考えられるようになった。すなわち、導入遺伝子由来の mRNA が分解される機構が植物に備わると、その遺伝子と相同な遺伝子を持つウイルス RNA も RNA 分解機構の対象となることになる。このような抵抗性は同種のまたはごく近縁なウイルスにのみ効果を示すことが多く、塩基配列の相同性が抵抗性または感受性の表現型を決定することから相同性依存型ジーンサイレンシング (homology dependent gene silencing) または相同性依存型抵抗性 (homology dependent resistance) とも呼ばれている (Muller et al., 1995)。以後、ジーンサイレンシングとウイルス抵抗性の関連について研究が進展し、ウイルス遺伝子導入植物におけるウイルス抵抗性機構の多くは PTGS によるものと考えられるようになった (Baulcombe, 1996; van den Boogaart et al., 1998)。

PTGS はその後の研究により現在までにその詳細な分子メカニズムが解明されている。1998 年、線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の体内に二本鎖 RNA (dsRNA) を導入すると、センス RNA またはアンチセンス RNA を導入した場合よりも dsRNA に相同な配列を持つ遺伝子の発現が効率よく抑制されることが報告され、RNA 干渉 (RNA interference; RNAi) と呼ばれた (Fire et al., 1998)。これとほぼ同時期に、dsRNA を植物内で形成させることにより PTGS が誘導されることが示された

(Waterhouse et al., 1998)。また、カビでも外来遺伝子による遺伝子発現抑制 (quelling) が報告されている (Cogoni and Macino, 1997)。同様な現象はショウジョウバエの他、マウスや人などの動物でも発見され (Elbashir et al., 2001a, b; Billy et al., 2001)、特定の RNA 配列を分解する現象は広く真核生物に保存されていることが明らかとなり、これらの現象を総称して RNA サイレンシングと呼ばれるようになった (Vance and Vaucheret, 2001; Waterhouse et al., 2001; Baulcombe, 2004)。RNA サイレンシングを起こした細胞内では、形成された dsRNA から Dicer などの RNaseIII 様酵素によって 21~24 塩基長の small interfering RNA (siRNA) が生じる。この RNA が RNA induced silencing complex (RISC) の活性中心である Argonaute (AGO) タンパク質に取り込まれ、RISC 内の small RNA が相補的な配列をもつ mRNA と作用して遺伝子の発現抑制が起こることなどが明らかとなっている (Bartel, 2004; Meister and Tuschl, 2004; Tomari and Zamore, 2005)。

このように植物ウイルスの遺伝子配列の一部を導入した遺伝子組換え植物がウイルス抵抗性を示すことが明らかにされ、さらにそのメカニズムの詳細が解明された。しかし、この手法により作出されたウイルス抵抗性作物にはまだいくつかの課題が存在する。その一つとして、抵抗性の範囲が狭く、一般にウイルス特異的であるか、または対象ウイルス内でも塩基配列の近い系統にのみ特異的な抵抗性を示すと考えられることである。特に、CP遺伝子などの導入によりどの範囲のウイルス系統にまで抵抗性を示すのかは不明な部分が多い (Lindbo et al., 1993; Tennant et al., 1994; Muller et al., 1995)。もう一つの課題は、遺伝子組換えにより特定のウイルスに対する抵抗性を付与した植物に、対象ウイルスとは異なるウイルスが感染すると宿主植物の抵抗性へ影響を与える可能性があることである。ジャガイモYウイルス (potato virus Y, PVY) のNIa遺伝子を導入したPVY抵抗性形質転換タバコにCMVが感染すると一過的にPVY抵抗性が打破され、PVYが感染するようになる (Mitter et al., 2003)。また、ウメ輪紋ウイルス (plum pox virus, PPV) のNIb遺伝子を導入し、PPV抵抗性を示す *Nicotiana benthamiana* にCMVが感染するとPPV抵抗性が打破され、PPVに感染するようになるが、tobacco vein mottling virus (TVMV) を感染させてもPPV抵抗性は打破されない (Simón-Mateo et al., 2003)。このようにウイルス遺伝子の部分配列の導入により実用的な作物にウイルス抵抗性を付与しても、その抵抗性が自然環境下においてどの程度ウイルスの系統や他のウイルス感染によって打破されるかは明確ではない。

ポティウイルス属 (以下 Potyvirus) は植物 RNA ウイルスの中で最も大きな科であるポティウイルス科に属し、PVY をタイプ種とし、アブラムシによって非持続伝搬される。ウイルス粒子は長さ 700-750nm、幅 11-12nm のひも状の粒子形態を示し (Brandes and Berchs, 1965)、ゲノムは約 10,000 nt の一本鎖 RNA で構成されている (Hollings and Brunt, 1981)。Potyvirus は宿主範囲が比較的狭いものが多いが、多くの作物で発生している (Shukla et al., 1994)。また、世界で発生する最も被害の大きいウイルス上位 10 種には PVY 及び PPV の 2 種類の Potyvirus が含まれるなど、重要なウイルス群とされている (Scholthof et al 2011)。そこで本研究では、Potyvirus に属するオオムギ微斑ウイルス (barley mild mosaic virus, BaMMV) およびカブモザイクウイルス (turnip mosaic virus, TuMV) を研究対象とし、BaMMV では日本に発生している BaMMV には病原性及び血清関係の異なる少なくとも 2 系統が存在することを明らかにし、抵抗性が打破されにくい品種育成の必

要性を示唆する知見を得た。また、TuMV では、シロイヌナズナと *N. benthamiana* を用い、CP 等の TuMV 遺伝子を導入した形質転換体を作成して RNA サイレンシングにより TuMV 抵抗性を示す複数の形質転換系統を得た。さらに、CP を導入したシロイヌナズナ形質転換体から、病原性や塩基配列の相同性が異なる多数の TuMV に対して抵抗性を示す形質転換系統を選抜した。また、CP を導入した TuMV 抵抗形質転換体に、神奈川県で分離した CMV や PVY の他、ジャガイモ X ウイルス (potato virus X, PVX) など、TuMV とは異なるウイルスが感染した際の TuMV に対する反応について解析を行い、CMV が TuMV 抵抗形質転換体に感染した場合に RNA サイレンシングを抑制するだけでなく、TuMV 抵抗性を打破する可能性があることを明らかにした。

なお、植物ウイルスに対する抵抗性反応を示す用語には一般に「抵抗性」の他に「免疫性」や「耐病性」などが使用されている。本研究では「抵抗性」を基本的に使用し、そのレベルに応じて「病徴遅延型抵抗性」、「回復型抵抗性」などの用語を用いた。

第2章 植物ウイルスに見られる病原性の分化

ウイルス抵抗性品種はウイルス病を効果的に防除する手法の一つであり、交配育種により感受性品種に抵抗性遺伝子 (R遺伝子) を導入する事により作出される。一方、R遺伝子を導入して育成された作物ではウイルス遺伝子の変異によって抵抗性が打破される事例が数多く見られる。例えば、トバモウイルス属ウイルスに対するR遺伝子として、トマトのTm-1、Tm-2及びTm-2²、トウガラシのL遺伝子などがあり、抵抗性育種に利用されている。ToMVに対するR遺伝子では、ウイルス遺伝子の変異によって宿主植物内での増殖が可能になり、抵抗性が打破される場合があることが明らかにされている (Meshi et al., 1988, 1989; Weber et al., 1993)。また、ピーマンやトウガラシが属するカプシカム属には、トウガラシマイルドモットルウイルス (pepper mild mottle virus, PMMoV) に対して抵抗性を示すL遺伝子 (L¹~L⁴)が知られており、抵抗性品種に導入されてきた。しかしこれらの抵抗性遺伝子も完全にPMMoVを防除できるものではなく、これを打破するウイルス系統が発生している (Berzal-Herranz et al, 1995)。穀類では、オオムギ縞萎縮ウイルス (barley yellow mosaic virus, BaYMV) 抵抗性遺伝子を導入したオオムギ品種が複数育成されたが、これを侵すBaYMV系統が発生するようになった(Kashiwazaki et al., 1989)。このように、交雑育種によって育成された抵抗性品種は、ウイルス遺伝子の変異によって抵抗性が打破されるだけでなく、すでに存在する特定のウイルス系統に対して感受性である場合があり、栽培の拡大に伴い、抵抗性を打破するウイルス系統が顕在化するようになることが知られている。本章ではPotyvirusであるBaMMV及びTuMVを対象に、新系統による抵抗性の打破や、系統間における病原性等の特性の違いを調べた。

第1節 BaMMVにおける新系統の発生

1. 緒言

オオムギ縞萎縮病はネコブカビ類の1種である*Polymixa graminis* によって土壌伝染するウイルス病であり、日本の他、中国、ヨーロッパなど世界各国で発生し、オオムギに減収や品質低下などの大きな被害を与える重要病害である。本研究を実施した1992年当時、日本ではオオムギ縞萎縮病の病原としてBaYMVのみが知られていたが、ヨーロッパでは、BaYMVとBaMMVの2種が本病に関与することが報告されていた (Huth et al, 1984; Huth and Adams,1990)。BaYMVとBaMMVはいずれもポティウイルス科バイモウイルス属に属し、いずれも550 nmと275 nmの長短2成分のひも状粒子から成り、形態的には区別出来ないが、主に血清関係の違いから別種とされた (Huth and Adams,1990)。その後、それぞれのウイルスゲノムの一部もしくは全塩基配列が決定され、配列相同性が低いことも確かめられた (Kashiwazaki et al, 1990; Kashiwazaki, et al, 1992)。

オオムギ縞萎縮病の被害を防ぐためには抵抗性品種を利用するのが最も効果的であることから、日本においても多くのBaYMV抵抗性オオムギ品種が育成されてきた。日本で同定されたBaYMV抵抗性遺伝子には*rym1*、*Rym2*、*rym3*、*rym5*、*rym6* などがあり(旧表記*Ym*、*ym* (Konishi, 2000; Konishi et al., 2002))、これらを持つ典型的な品種にはミサトゴールドン (*rym5*)、ミカモゴールドン (*rym5*)、きぬゆたか (*rym5*)、御堀裸3 (*Rym2*)、はがねむぎ (*rym3*)、イシユクシラズ (*rym3*) などがある。しかしこれらの品種のいくつかは、BaYMVの新系統の発生によって被害を受けるようになった。

例えば1984年に育成されたミサトゴールドデンは、導入されるとすぐに $rym5$ を侵すBaYMV III型の出現によって罹病した。これに対し、イシュクシラズではBaYMVの感染は認められていない。しかし、1989年、香川県のイシュクシラズ及び山口県のきぬゆたかに縞萎縮病が発生し、BaMMVが分離された (Kashiwazaki et al, 1992; 野村ら 1992)。このうち、山口県で発生したBaMMV-Na1分離株は $rym5$ をもつオオムギにも感染が確認されたが、香川県分離株であるBaMMV-Ka1は $rym5$ オオムギでの発生は確認されなかった。そのため、BaMMV分離株間でも種々の特徴が異なる可能性がある。そこで、本節ではこれらのBaMMV分離株についてオオムギ品種への感染性と血清学的性質を比較解析し、これらが異なる病原性及び血清型を示すことを明らかにした。

2. 材料及び方法

(1) ウイルス分離株

1989年に香川県高松市の香川県農業試験場内の圃場で採集したモザイク症状を呈するイシュクシラズから汁液接種により得られたBaMMV分離株 (Ka1)、及び1990年に山口県山口市名田島の圃場で採集したモザイク症状を呈するきぬゆたかから得られたBaMMV分離株 (Na1) を供試した。また、BaMMVのドイツ分離株 (M) (Huth et al.,1984)、BaYMVの系統II-1型およびIII型 (Kashiwazaki et al.,1989) を実験に用いた。

(2) 汁液接種試験

ウイルス分離株はオオムギ品種ニューゴールドデンに汁液接種して継代・増殖した。各ウイルス分離株をオオムギ26品種に汁液接種して反応を調べた。オオムギ品種はKashiwazakiら (1989) がBaYMVの系統分類に用いたもので、BaYMV抵抗性遺伝子を持つものを中心に選定した。汁液接種は乳鉢中で病葉に3倍量の0.1Mリン酸緩衝液及びカーボランダムを加えて磨砕し、1.5葉から3葉のオオムギ苗に指で摩擦接種した。接種した苗は13-15°C のグロースキャビネット内で生育させ、病徴を観察した。各品種8個体以上の苗に接種し、実験は3反復で行った。

ウイルス分離株のオオムギへの感染に対する温度の影響を調べるため、BaMMV-Ka1、Na1及びMと、BaYMV-II-1をオオムギ品種ニューゴールドデンの苗に汁液接種し、15°C及び20°Cに設定したグロースキャビネット内で生育させ、接種15日後から40日後までの間、5日ごとに病徴を発現した個体の数を数えて発病率を求めた。接種40日後におけるウイルス感染の有無はELISA法により検定した。各試験区ごとに40個体の苗に接種し、実験は2反復で行った。

(3) ウイルスの精製

BaMMV-Ka1、Na1及びMを感染させたオオムギから宇杉ら (1976) の方法に従ってウイルスを精製した。すなわち、ウイルス感染葉300 gに3倍量の0.1 Mクエン酸緩衝液 (pH6.8) を加えて乳鉢で磨砕し、ガーゼでろ過した後、四塩化炭素とジエチルエーテルをそれぞれ1/5容量加え、スターラーで攪拌した。次に6,000×gで10分間遠心分離し、上層をさらに9,000×gで20分間遠心分離して得た上清を、42,000×gで60分間超遠心分離にかけた。沈殿をクエン酸緩衝液に懸濁し、さらに9,000

×g、42,000×gの分画遠心を2度行い、3回目の超遠心分離の後に得た沈殿を8 mlクエン酸緩衝液に懸濁、塩化セシウムを25%溶解し、スイングローターで36,000×g、16時間の超遠心分離を行った。ウイルスを含むバンドを注射器で回収し、54,000×g、60分間超遠心分離後の沈殿を300 µlのクエン酸緩衝液に懸濁し、さらにきょう雑物を取り除くため、8,000×gで10分間遠心分離を行った上清を精製ウイルスとした。ウイルス濃度は分光光度計 (Beckman) で測定し、 $E_{260}=3$ を1mg/mlとして計算した。

(4) ELISA法による検出

BaMMV-Ka1 及び Na1 の抗血清を得るため、精製したウイルス 0.5 mg を 2 週間間隔でアジュバント法により 3 回筋肉注射してウサギを免疫した。最後の注射から 3 週間後に耳の静脈から採血を行ない、抗血清を得た。その他に、M 抗血清 (Kashiwazaki et al., 1989) を実験に用いた。Clark と Adams の方法 (1977) に従い、各抗血清から γ -グロブリンを精製し、アルカリフォスファターゼ結合抗体 (コンジュゲート) を作製した。オオムギへの接種試験におけるウイルス検定では、 γ -グロブリンは PBS で 2 µg/ml の濃度に希釈したものをコーティングに用い、コンジュゲートは 600 倍に希釈して使用した。

また、Ka1 と Na1 を ELISA 法により識別する目的で、Ka1 抗血清 (1 ml) に Na1 の精製ウイルス (1mg) を混合し、4°C で 16 時間静置することで Ka1 と Na1 に共通する抗体を精製ウイルスに吸収させた。その後、超遠心分離 (54,000×g) によりウイルスを沈殿させ、上清を回収することで Na1 吸収 Ka1 抗血清を作製した。また、同様の手法により Ka1 吸収 Na1 抗血清を作製した。各吸収抗血清は硫酸沈殿及びリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) による透析を行った後にアフィゲルプロテイン A (Bio-Rad) により IgG を回収し、さらにコンジュゲートを作製して ELISA に用いた。各吸収抗血清から精製した γ -グロブリンは PBS で 4 µg/ml に希釈したものをコーティングに用い、コンジュゲートは 200 倍に希釈して使用した。BaMMV 分離株の ELISA による反応を調べるため、精製した各ウイルスの濃度を 20 µg/ml から 0.625 µg/ml まで順次 2 倍希釈したものを抗原とし、精製した各抗体に対する BaMMV 分離株間の反応を調べた。

γ -グロブリンのコーティング時間は 37°C、2 時間、ウイルスとの反応を 4°C、4 時間、コンジュゲートの反応時間を 37°C、4 時間、基質の反応を室温で 30 分～1 時間とし、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) により吸光度 410nm の値を測定した。

3. 結果

(1) オオムギ品種の反応

オオムギ品種のウイルス分離株に対する反応を汁液接種により調べた。BaMMV または BaYMV に感染した個体はいずれもモザイク症状を示し、ELISA 法でウイルスが検出されたが、黄化やえその程度は品種とウイルス分離株の組合せによって異なっていた。まずオオムギに着目すると、供試 26 品種中 BaMMV の全ての分離株に感染したのは 11 品種であり、10 品種については全ての BaMMV の感染が認められなかった。残りの他の 5 品種については BaMMV 分離株の間で感染に違いが認められた。

次にウイルスに着目した場合、BaMMVとBaYMVを比較すると、BaMMV-Ka1、Na1及びMは、いずれも汁液接種により、イシクシラズ、はがねむぎなど、BaYMVの感染が認められない5品種に感染し、モザイク症状を示した（第1図、第1表）。また、抵抗性遺伝子に着目した場合、*rym3*を持つ品種に関しては、上記2品種以外に竹林茨城1号Ea52に感染したが、マサカドムギ及び朝鮮には感染しなかった。抵抗性遺伝子*rym5*を持つ品種では、Na1及びMはミサトゴールド、ミカモゴールド、きぬゆたかには感染したが、Ka1は感染しなかった。また、これらの品種に*rym5*を導入した交配親である木石港3にはいずれの分離株も感染しなかった。六条オオムギの中では、Ka1及びMは白麦6号、東山皮73号に感染したが、Na1は感染しなかった。このように、BaMMV分離株間でオオムギ品種に対する病原性に違いが認められた。

ウイルス分離株間で病徴に違いが認められた主な7品種を第2表に示す。ニューゴールド、あかぎ二条、東山皮73号、及び白麦6号などの品種では、BaYMV-II-1はBaMMVの各分離株に比べ、激しいえそ症状が認められた。また、BaMMV分離株間の病徴を比較すると、Ka1とMは比較的類似しているが、Na1ではニューゴールド、あかぎ二条などの品種でえそや黄化の程度が軽かった。しかしセンボンハダカでは、Na1はKa1及びMよりも激しいえそ病斑を現すなど、品種により病徴の違いが認められた（第2表）。

(2) ウイルスの感染に及ぼす温度の影響

各ウイルス分離株をニューゴールドに汁液接種し、15℃及び20℃のグロースキャビネット内で育成して病徴発現時期と発病率を調べた（第2図）。15℃の温度条件下ではいずれの分離株を接種した場合も接種後15日ごろから病徴を発現し始め、BaMMVの各分離では接種後35日には70～80%の発病率を示したが、BaYMV-II-1では57%とやや低かった。また、20℃の温度条件下では、Ka1及びMは接種35日後の時点で45～70%の個体が病徴を示したが、Na1の発病率は10%以下であり、また、BaYMV-II-1は病徴を示す個体は認められなかった。ELISA法による検定では、病徴を示さなかった個体からはウイルスは検出されなかった。

(3) ELISA法による検出

BaMMVの純化試料を20µg/mlから順次2倍希釈したものを抗原とし、ウイルス間の血清反応をELISA法により調べた。Ka1、Na1及びMはいずれもKa1、Na1抗血清またはM抗血清を用いて検出できたが、BaMMV分離株と抗血清の組合せにより反応に違いが認められた。Ka1及びMはいずれもKa1抗血清またはM抗血清と強く反応したが、Na1はKa1抗血清またはM抗血清との反応は弱かった。一方、Na1抗血清を用いた場合、Na1とは強く反応したが、Ka1及びMとの反応が弱かった（第3図 A～C）。さらに、Na1吸収Ka1抗血清から精製したIgGを用いたELISAでは、Ka1及びMは反応したが、Na1とは反応しなかった。同様に、Ka1吸収Na1抗血清によるELISAではNa1にのみ特異的に反応し、Ka1及びMとは反応しなかった（第3図 D, E）。



第1図 汁液接種による BaMMV の病徴.

A : Ka1 を接種し、30 日後のニューゴールドデンの病徴

B : 対照植物

C : Ka1 を接種し、30 日後のイシュクシラズのマザイク症状(矢印)

D : Na1 を接種し、30 日後のイシュクシラズのマザイク症状(矢印)

第 1 表 オオムギ品種のウイルス分離株に対する反応

オオムギ品種	BaMMV			BaYMV	
	Ka1	Na1	M	II-1	III
二条オオムギ					
ニューゴールドデン	+ a)	+	+	+	+
あかぎ二条	+	+	+	+	+
はるな二条	+	+	+	-	+
あまぎ二条(<i>rym6</i>)	+	+	+	-	+
ミサトゴールドデン(<i>rym5</i>) ^{b)}	-	+	+	-	+
ミカモゴールドデン(<i>rym5</i>)	-	+	+	-	+
きぬゆたか(<i>rym5</i>)	-	+	+	-	NT
イシュクシラズ(<i>rym3</i>)	+	+	+	-	-
Diana(<i>rym4</i>)	-	-	-	NT	NT
六条オオムギ					
上州白裸	+	+	+	-	+
大正麦	+	+	+	+	-
センボンハダカ	+	+	+	-	-
あさまむぎ	+	+	+	-	-
はがねむぎ(<i>rym3</i>)	+	+	+	-	-
竹林茨城 1 号 Ea52(<i>rym3</i>)	+	+	+	-	-
東山皮 73 号	+	-	+	+	+
白麦 6 号	+	-	+	+	+
カシマムギ	-	-	-	+	+
木石港 3(<i>rym1, rym5</i>)	-	-	-	-	-
御堀裸 3 号(<i>rym2</i>)	-	-	-	-	-
竹林茨城 1 号	-	-	-	-	-
マサカドムギ(<i>rym3</i>)	-	-	-	NT	NT
朝鮮(<i>rym3</i>)	-	-	-	NT	NT
キカイハダカ	-	-	-	-	-
四系 8362	-	-	-	-	-
Franka(<i>rym4</i>)	-	-	-	NT	NT

a) + : 感染して病徴を示し、ELISA によりウイルスが検出された品種。

- : 病徴が認められず、ELISA によりウイルスが検出されなかった品種。

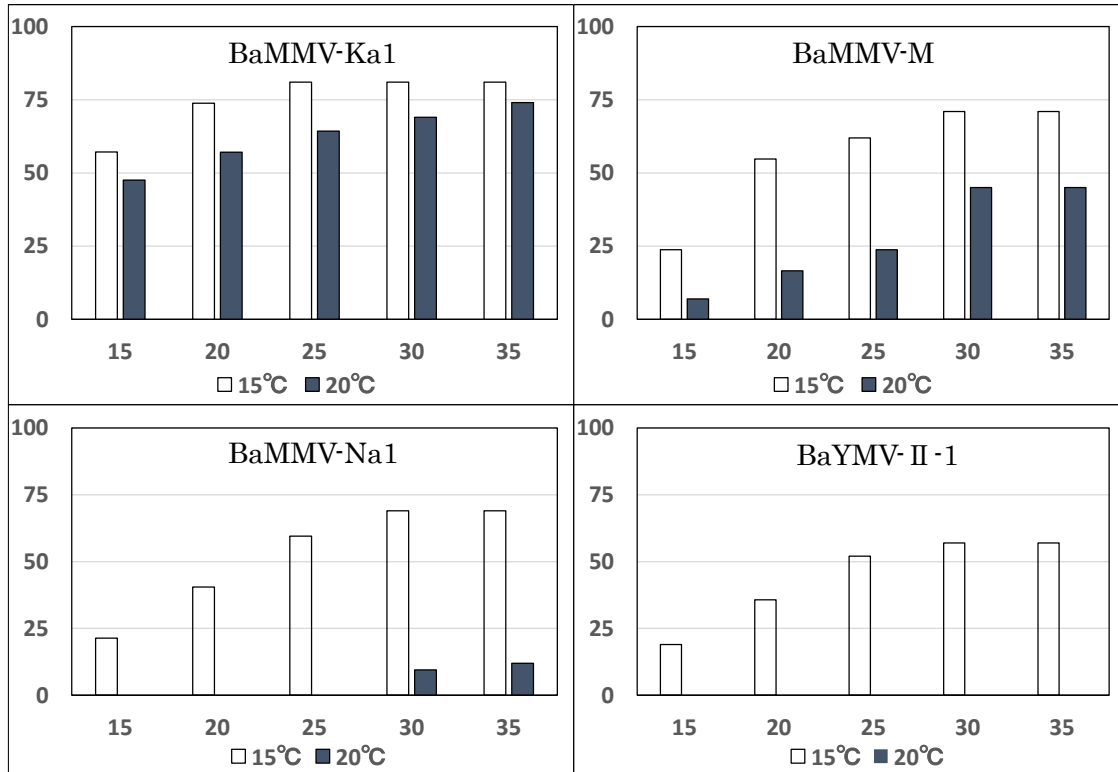
NT : 無試験

b) カッコ内は BaYMV 抵抗性遺伝子を表す。

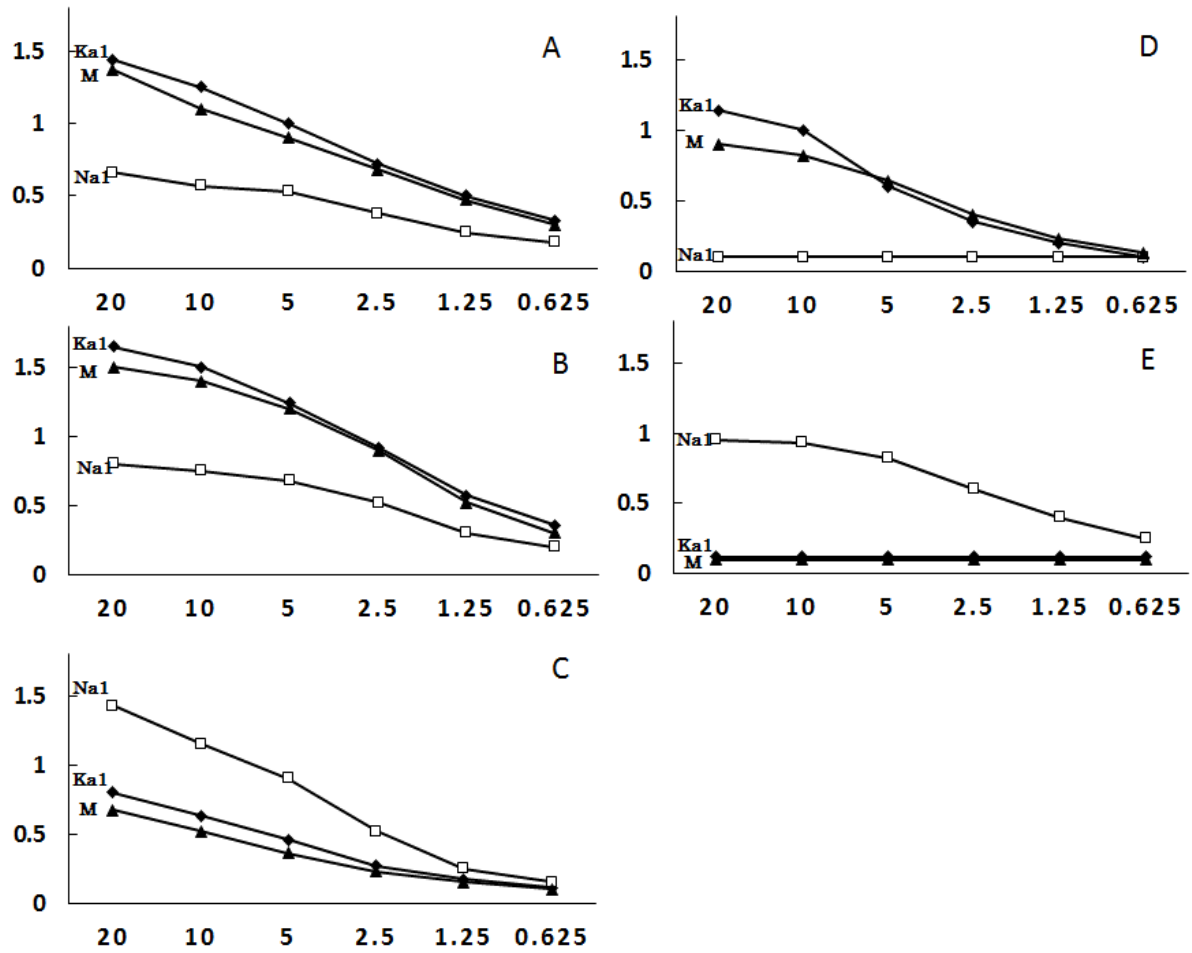
第2表 数種オオムギ品種のウイルス分離株に対する病徴の違い

オオムギ品種	BaMMV			BaYMV
	Ka1	Na1	M	II-1
二条オオムギ				
ニューゴールドデン	M, SN, Y	M	M, N, Y	M, SN, Y
あかぎ二条	M, N, Y	M, Y	M, N, Y	M, SN, Y
きぬゆたか(<i>rym5</i>)	-	M, N, Y	M, Y	-
イシュクシラズ(<i>rym3</i>)	M	M	M	-
六条オオムギ				
東山皮 73 号	M	-	M	M, SN, Y
白麦 6 号	M	-	M	M, SN, Y
センボンハダカ	M	M, SN	M	-

M: モザイク、 N: えそ、 SN: 激しいえそ、 Y: 黄化
 -: 病徴が認められず、ELISAによりウイルスが検出されない品種。



第2図 BaMMVまたはBaYMVを接種したニューゴールドンの異なる温度条件下における発病率の推移。
 グラフの縦軸は発病率(%)を、横軸は接種後日数(日)を表す。



第3図 ELISA法によるBaMMV分離株の反応の比較.

グラフの縦軸は吸光度410nmの値を、横軸はウイルス濃度(µg/ml)を表す。

A: Ka1抗血清に対する精製ウイルスの反応

B: M抗血清に対する精製ウイルスの反応

C: Na1抗血清に対する精製ウイルスの反応

D: Na1吸収 Ka1抗血清に対する精製ウイルスの反応

E: Ka1吸収 Na1抗血清に対する精製ウイルスの反応

4. 考察

BaMMVの研究はこれまでにBaYMVの系統と比較して行われてきた (Adams et al 1987; Huth et al 1984; Kashiwazaki et al 1989)。しかしBaMMVにおける系統の存在については不明であった。そこで本研究では、BaMMVの3つの分離株と、BaYMVの2系統について、諸性質の相互比較を行った。

BaMMVの3分離株とBaYMV-II-1に共通して感染するニューゴールドンなどの4品種の病徴を比較すると、BaMMVの方がBaYMVよりも一般にえそ及び黄化の程度が軽く、また、BaMMVの間ではKa1とMに感染した品種の病徴は類似していた (第2表)。また、15°Cと20°Cの温度条件下では、BaMMVは分離株により感染率に差が認められるものの、BaYMVの感染が認められない20°Cでも感染した (第2図)。15°Cでの感染率が20°Cよりも高く、BaMMVの感染における適温は20°Cよりも低いが、オオムギへの感染適応温度はBaMMVの方がBaYMVよりも高いと考えられる。これらの結果は、BaMMVはBaYMVよりも病徴が軽く、増殖適温が高いとする報告とも一致する (Adams et al 1987; Huth and Adams, 1990)。また、BaMMV分離株間では、Ka1とMは20°Cの温度条件下でも比較的高率で感染するなど、発病条件が類似していたが、Na1の感染率は低く、感染適応温度に差が認められた。これらの結果から、BaMMVには病徴や感染・増殖における温度感受性などの発病条件が異なる少なくとも2つのタイプが存在すると考えられた。

オオムギ品種のBaMMVに対する反応を比較すると、Ka1、Na1及びMはミサトゴールドン、白麦6号など、オオムギ品種に対する病原性に差が見られた (第1表)。また、一部のオオムギ品種において発現する病徴が異なっていた (第2表)。BaYMVでは日本やヨーロッパにおいてオオムギ品種に対する病原性の異なる系統が分離されているが (Kashiwazaki et al 1989)、BaMMVでも同様にオオムギ品種に対する病原性の異なる系統が存在することが明らかとなった。BaYMV抵抗性遺伝子を持つ品種の反応を見てみると、*rym5*を持つミサトゴールドン、ミカモゴールドン及びきぬゆたかには、Na1及びMは感染したが、Ka1は感染しなかった。また、これらの品種の親である木石港3にはいずれの分離株も感染しなかった。*rym5*を持つ品種はBaYMVのⅢ型には感受性であるが、他のBaYMV系統には抵抗性を示すことが知られている (Kashiwazaki et al 1989)。一方、BaMMVでは*rym5*を持つ品種はKa1にのみ抵抗性を示した。また、これらの品種の親である木石港3はBaYMV及びBaMMVのすべての系統に対して抵抗性であった (Kashiwazaki et al 1989; Götz et al 1991; Jianping et al 1992; 第1表)。木石港3にはBaYMV抵抗性遺伝子として*rym1*、及び *rym5*の存在が報告されているが (Konishi and Kaiser, 1991)、BaMMV抵抗性遺伝子も有している可能性があり (Götz et al 1991)、抵抗性遺伝資源として今後の更なる研究が必要である。また、*rym3*を持つイシユクシラズ、はがねむぎ及び竹林茨城1号Ea52にはBaMMVの3分離株はいずれも感染することから、*ym3* はBaYMVに対して特異的に働く遺伝子であると考えられる。一方、同じく*rym3*をもつマサカドムギ、朝鮮にはBaMMVの3分離株はいずれも感染しなかった。したがって、これらの品種には*rym3* 以外にBaMMV抵抗性遺伝子を有している可能性がある。

BaMMVは当初、BaYMVの1系統と考えられていたが、主に血清関係が異なることから別種と考えられるようになったウイルスである (Huth and Adams, 1990)。ELISA法による血清反応では、BaMMV分離株はいずれも相互に反応し、BaMMV-MとKa1は近縁であるが、Ka1とNa1では共通す

る抗原以外に、それぞれに特異的な異種抗原を持つなど、血清学的にもやや離れた関係にある BaMMV であり、BaMMV における血清型の異なる系統の存在が明らかとなった。

以上の結果から、Ka1 と Na1 は病原性及び血清型の異なる BaMMV の系統であり、日本で発生している BaMMV には病原性の異なる系統が存在すること、また、異なる血清型が存在することが明らかとなった。オオムギ縮萎病では BaYMV 抵抗性遺伝子の同定と、その導入による品種育成が進められてきたが、育成品種の罹病によって BaYMV における新系統の発生が顕在化し、被害が拡大しており、これまでよりも多様な BaYMV 系統に対する抵抗性遺伝子の同定と品種育成が求められる状況が続いている (Konishi and Kaiser, 1991)。一方、BaMMV は現在、国内 2 か所でしか発生が確認されていないが、BaYMV 抵抗性品種に感染することから、その普及に伴い、さらに各地で発生する可能性がある。このようにオオムギ縮萎病抵抗性については、BaYMV 抵抗性遺伝子が BaYMV の系統によって打破されるという問題と、BaYMV 抵抗性品種の普及によって BaMMV という新たなウイルスが発生するという問題を含んでいる。今後は BaMMV に感染したオオムギのは場レベルでの被害の実態を明らかにするとともに、品種反応をさらに調査して BaMMV 抵抗性遺伝子を同定し、BaMMV 抵抗性を導入した育種も進めていく必要がある。

植物ウイルスはゲノム遺伝子の変異や組み換えによって進化を遂げ、新しい宿主に適応することが TuMV では明らかにされている (大島, 2012)。そこで第 2 節以降は神奈川県のアブラナ科野菜で問題となる TuMV を対象とし、神奈川県に発生する TuMV の特性を明らかにするとともに、第 3 章以降では遺伝子組換え技術を活用した TuMV 抵抗性品種育成の可能性について調べることにした。

第2節 神奈川県で分離した TuMV の特性

1. 緒言

TuMV はダイコン、カブ等の野菜やナタネなどのアブラナ科作物に感染するウイルスである。日本を含むアジアの他、アフリカ、アメリカ、ヨーロッパなど世界各国でも発生し、アブラナ科作物における最重要ウイルスの一つとされている (Tomlinson, 1987)。日本では特にダイコンにおける重要病害の一つとして研究が進められてきた。栃原 (1965) は日本各地におけるダイコン等のアブラナ科作物から分離されるウイルスの病徴、病原性、粒子形態、血清反応等の性状を比較したところ、最も多く分離され、かつ病原性の強いのは TuMV であることを示すとともに、数種類の検定植物に対する病原性の異なる系統が存在することを示した。

神奈川県では過去に三浦半島地域で栽培されている三浦ダイコンで被害が重要視され、根の表面が奇形になり、肉質が硬化するガリ症状の原因として研究が行われた。このガリ症状は 1949 年頃から発生し、1952 年と 1957 年に大発生して問題となった。ガリ症状の原因について研究が進められ、病原が TuMV であることが解明された。その後、媒介昆虫であるアブラムシを効果的に防除する方法が検討され、普及している (宇田川, 1996)。1970 年から 1978 年にかけて神奈川県におけるダイコンモザイク病の発生活消長が調査され、県内各地の秋ダイコンにおいてモザイク病の多発年と少発年があり、多発年では減収要因となることを示すとともに、その病原ウイルスが TuMV とキュウリモザイクウイルス (CMV) であることが報告された (近岡ら 1981)。また、神奈川県近郊では、東京の練馬地方で作られていたダイコンが大きな被害を受け、寒冷紗被覆等を利用したアブラムシの飛来防止による総合防除対策の研究が進展している (馴松ら 1953)。

アブラナ科作物の基本種は A ゲノム、B ゲノム、及び C ゲノムに大別されており、ハクサイなどが属する *Brassica campestris* (AA、 $2n=20$)、クロガラシなどが属する *B. nigra* (BB、 $2n=16$) 及びキャベツなどが属する *B. oleracea* (CC、 $2n=18$) と、これらの交雑により生じた異質倍数体としてナタネなどが属する *B. napus* (AACC、 $2n=38$)、*B. carinata* (BBCC、 $2n=34$) などがある。また、これらのゲノム構成により TuMV に対する感受性が異なることが知られている (Yoshii, 1963)。TuMV にはキャベツなどの C ゲノムをもつアブラナ科野菜に対する病原性の異なる系統の存在が知られており、ダイコンに感染するがキャベツに感染しないものを普通系統、キャベツに感染するがダイコンには感染しないものをキャベツ系統に分類している (Tezuka and Ishii, 1983)。キャベツなどの C ゲノムをもつ作物は TuMV 普通系統に対する抵抗性遺伝子を持つことが推定されており、Kaneko ら (1996) は C ゲノムに属するケールの染色体をダイコンに導入した 1 染色体添加型ダイコンを育成して TuMV 抵抗性検定を行い、ケールの持つ TuMV 普通系統に対する抵抗性遺伝子座を同定している。

植物ウイルスに対する抵抗性・病原性は植物の持つ遺伝因子とウイルス側の遺伝因子との相互作用によって決定されているため、植物ウイルスのゲノム性状を解明することは重要である。TuMV が属する Potyvirus は約 10,000 塩基のプラス鎖 RNA からなり (Hollongs and Brunt, 1981)、ウイルスゲノムにコードされた各タンパク質は大きなポリタンパク質前駆体として翻訳された後、自身がコードする加水分解酵素によって約 10 のタンパク質に切断される (Dougherty and Carrington,

1988)。その順序は 5'側から P1 プロテアーゼ (first protein)、HC-Pro (helper component-protease)、P3 (third protein)、6K1 (6K first protein)、CI (cylindrical inclusion protein)、6K2 (6K second protein)、NIa-VPg (small nuclear inclusion protein-viral protein genome linked)、NIa-プロテアーゼ、NIb (large nuclear inclusion protein)、外被タンパク質 (CP:coat protein) である (第 4 図)。Potyvirus のゲノム情報は分類上の有力な手掛かりとなっており、さらにその配列情報から Potyvirus がコードする遺伝子の機能推定がなされている。

TuMV は世界的に重要なウイルスの一つであり、これまでに多くの分離株について塩基配列が決定されてきた。Nicolas と Laliberte (1992) はカナダ分離株の全塩基配列を、Ohshima ら (1996) は日本分離株の全塩基配列を決定し、それぞれ 9830 及び 9833 ヌクレオチドから構成されていることを示した。Ohshima ら (2002) はその後、ダイコンに対する感染性のある TuMV を BR 系統、ダイコンに感染しない TuMV を B 系統に大別するとともに、世界各地から収集した 76 分離株における CP 遺伝子と P1 遺伝子の塩基配列を決定・比較し、これらの分離株が分子系統学的に大きく 4 つのグループに分類できることを示した。Tomimura ら (2003) はさらにこれらの分離株を含む 32 分離株について全塩基配列を決定し、ウイルスゲノムの組み換えが TuMV の分布・進化に関してきたことを示した。近年、ウイルス遺伝子を解析し、系統を比較することは、地域において発生しているウイルスの特性を知り、防除法を確立する上でも重要となっている。特に、外被タンパク質はウイルス粒子の主要な遺伝子産物であり、粒子の 90~95 %を占め、その性状は Potyvirus の分類にも有効である (Shukla and Ward, 1989)。そこで本章では神奈川県で栽培されているダイコン及びキャベツから TuMV を分離してその性状を調べるとともに、CP 遺伝子全長を含む 3'末端側の部分塩基配列を決定し、比較した。



第 4 図 TuMV の遺伝子構造.

P1 (first protein)、HC-Pro (helper component-protease)、P3 (third protein)、6K1 (6K first protein)、CI(cylindrical inclusion protein)、6K2 (6K second protein)、NIa-VPg (small nuclear inclusion protein-viral protein genome linked)、NIa-Pro (protease)、NIb (large nuclear inclusion protein)、CP (coat protein)

2. 材料及び方法

(1) ダイコン及びキャベツからの TuMV の分離

実験に供試したウイルスは、神奈川県農業技術センター内圃場で栽培されているダイコン（耐病総太り）のモザイク症状株及び平塚市内の圃場で栽培されていたキャベツ（金春）のモザイク症状株から 1997 年に分離したものである。これらの病葉にリン酸緩衝液（pH 7.0）を加えて乳鉢で磨砕し、カーボランダム法により *Chenopodium amaranticolor* に汁液接種した。接種葉の単一局部病斑を分離して汁液接種により *N.benthamiana* に全身感染させた。以下、ダイコン分離株を KR、キャベツ分離株を KC とした。モザイク・萎縮症状を示した上葉を接種源とし、数種検定植物での反応を調べた。検定植物には *C.amaranticolor*、*C.quinoa*、ダイコン、キャベツ、コカブ、ソラマメ、ササゲ、タバコ、*N. glutinosa* を用いた。TuMV-JO (MAFF01-04035) を対照として用いた。接種した植物の病徴を観察するとともに、ELISA により感染を判定した。

(2) TuMV の精製

TuMV の精製は Choi ら (1977) の方法を改変して行った。すなわち、TuMV をコカブに接種後、明確な病徴を示す上葉 100 g を -80 °C で保存後、0.1 %メルカプトエタノールを含む 200 ml の 0.5 M リン酸緩衝液（pH 7.4）を加えてミキサーで破砕し、ガーゼで濾過した。次に粗汁液の 1/2 相当量の四塩化炭素を加えて 5 分間攪拌した。7,000 ×g で 15 分間遠心して得られた上清に tritonX100 とポリエチレングリコール (#6,000) をそれぞれ 1 %及び 5 %の濃度になるように加えて 30 分間攪拌し、7,000 ×g で 15 分間遠心した。沈殿を 0.1 %メルカプトエタノールを含む 40 ml の 0.25 M リン酸緩衝液で懸濁し、8,000 ×g で 10 分間遠心後の上清を 38,000 ×g で 90 分間超遠心分離し、ウイルスを沈殿させた。次にホモジナイザーで攪拌して沈殿を懸濁し、2 ml 当たり 1 g の塩化セシウムを加え、溶解後、スウィングローターで 36,000 ×g、16 時間の密度勾配遠心を行った。ウイルスを含むバンドを L 字型注射器で回収し、0.1%メルカプトエタノールを含む 40 ml の 0.25 M リン酸緩衝液で懸濁、50,000 ×g で 1 時間超遠心した。沈殿を 500 µl の滅菌水に溶解後、分光光度計でウイルス濃度を測定した。

(3) 外被タンパク質の電気泳動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は Laemmli (1970) の方法に従い、試料を dissociation buffer (8% SDS, 8% 2-メルカプトエタノール, 0.04% ブロモフェノール・ブルー, 0.25 M tris-HCL, pH 6.8) で 2 分間煮沸した後、5%・15%のスラブゲルを用いて電気泳動した。分子量の測定には基準としてレインボウマーカー（ファルマシア）を用い、泳動後のゲルをコーマシーブリリアントブルーで染色した。

(4) 血清反応試験

TuMV 抗血清を得るために、家兎に 2 週間間隔で精製ウイルス 0.5 mg をアジュバンド法により 3 回筋肉注射した。最後の注射から 3 週間後に耳の静脈から採血を行った。

ELISA 法は Clark と Adams (1977) の方法に従い、γ グロブリンの精製及びアルカリフォスファターゼ結合抗体 (コンジュゲート) の作製を行った。

ウェスタンブロットでは SDS-PAGE 後のゲルからトランスブロット SD セル (BIO-RAD) を用いて分離したタンパク質を PVDF メンブレンに転写後、ブロッキングを行なった。精製した TuMV 抗体または CMV 抗体 (日本植物防疫協会) を 1 次抗体とし、2 次抗体にはアルカリフォスファターゼ結合抗ウサギ抗体 (BIO-RAD) を用い、キットのプロトコールに従ってシグナルを検出した。

(5) RNA の抽出

TuMV の RNA を純化試料から抽出した。まず、精製ウイルス懸濁液に DEPC 処理水を加えて容量を 200 μ l にし、10% SDS を 40 μ l 加えた。これに等量の水飽和フェノールを加えて振盪後、15,000 \times g で 10 分間遠心した。上清を回収し、再度フェノール抽出を行った後、クロロフォルム抽出を行なった。さらにエーテル抽出を 3 回繰り返した後、エタノール沈殿と 70% エタノールによる洗浄を行った。風乾したペレットを DEPC 処理水に溶解して RNA 試料とした。

(6) TuMV 遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

RT-PCR は RNA LA PCR キット (TaKaRa) を用い、TuMV の 3' 末端側配列を単離した。プライマーは、TuMV-UK1 (Sanchez et al, 1998) の塩基配列を基にプライマー設計用ソフト OLIGO (Molecular Biology Insight) を用いて設計した。逆転写には Oligo dT プライマーを用い、キットのプロトコールに基づいて 42°C、30 分間の反応後、99°C、5 分間処理して逆転写酵素を不活化させた。PCR 反応にはフォワードプライマーとして NibF2 (5'-GGATCCGACAAGTTAACTCACGAGAT-3') と、リバープライマーとして Oligo dT の各プライマーを加え、熱変性 94°C、30 秒、アニーリング反応 49°C、30 秒、伸長反応 72°C、1 分 30 秒で 35 サイクル反応させた。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、予想される大きさの断片を切り出し、スピнкаラム (TaKaRa suprec-1) で精製した。その後、DNA Ligation kit ver.2 (TaKaRa) を用いて pT7Blue-T-Vector (Novagen) に連結した。ライゲーション後の反応液をコンピテントセル DH5 α (TaKaRa) に形質転換した。LB プレート上のコロニーを LB 培地で 1 昼夜培養し、培養液 1~2 ml のスモールスケールでプラスミド調整後、制限酵素処理してインサートの有無を確認した。インサートの確認されたプラスミドをフェノール・クロロフォルム精製し、DNA シーケンサー (ABI3130) を用いてダイデオキシサイクルシーケンス法により塩基配列を決定した。塩基配列決定後、DNASIS (日立) を用いて TuMV の各種系統との相同性を比較した。

3. 結果

(1) 汁液接種試験

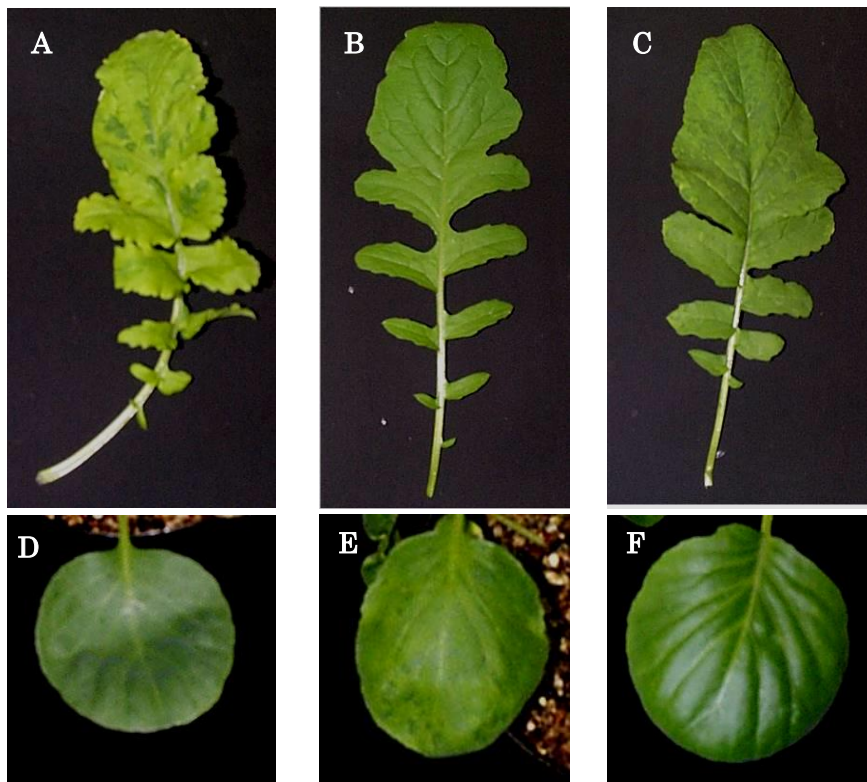
汁液接種試験の結果を第 3 表に示した。KR 及び KC はいずれも *C. amaranticolor* 及び *C. quinoa* の接種葉に TuMV-JO と同様の局部病斑を形成した。また、カラシナ、カブの接種葉にはえそ病斑を生じた後、上葉に激しいモザイク症状を引き起こし、全身感染した。その他、マメ科、ナス科の検定

植物にも JO と同様の局部病斑を生じた。これに対し、ダイコン及びキャベツに対する反応は分離株間で異なっていた。JO 及び KR はいずれもダイコンに全身感染したが、JO は弱いモザイク症状を示しただけなのに対して KR は激しいモザイク症状を示した。しかしこれらの分離株はいずれもキャベツには感染しなかった。これに対し、KC はキャベツに全身感染し、わずかにモザイク症状を示したものの、ダイコンには感染しなかった (第 5 図)。なお TuMV 接種後の検定植物における感染の有無については病徴観察のほか、ELISA により確認した。

第 3 表 各種検定植物の TuMV 分離株に対する反応

接種植物(品種)	TuMV分離株		
	KR	KC	JO
アカザ科			
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	N/- ^{a)}	N/-	N/-
<i>C. quinoa</i>	N/-	N/-	N/-
アブラナ科			
ダイコン(<i>Raphanus sativus</i> ; 耐病総太り)	NS/M	-/-	NS/m
キャベツ(<i>Brassica oleracea</i> ; 金春)	-/-	CS/m	-/-
カラシナ(<i>B. juncea</i> ; さがみグリーン)	NS/M	NS/M	NS/M
カブ(<i>B. campestris</i> ; 覆下相模)	NS/M	NS/M	NS/M
マメ科			
ソラマメ(<i>Vicia faba</i> ; 早生)	NS/-	NS/-	NS/-
ササゲ(<i>Vigna unguiculata</i> ; 黒種三尺)	NS/-	NS/-	NS/-
ナス科			
<i>Nicotiana tabacum</i> (<i>Xanthi nc</i>)	CS/-	CS/-	CS/-
<i>N. glutinosa</i>	NS/-	NS/-	NS/-

^{a)} 接種葉/上葉の病徴を表す。N：えそ、NS：えそ斑点、M：モザイク、m：弱いモザイク、CS：退緑斑点、-：非感染



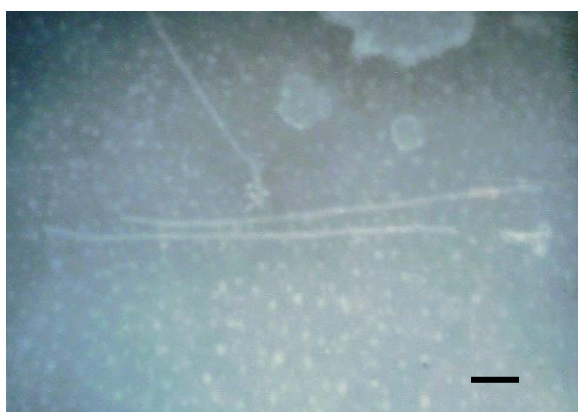
第 5 図 TuMV 分離株のダイコン(上) 及びキャベツ(下) に対する病原性.

- A : TuMV-KR 分離株に感染したダイコンのモザイク症状
- B : TuMV-KC 分離株を接種したダイコン(非感染)
- C : TuMV-JO 分離株に感染したダイコンの淡いモザイク症状
- D : TuMV-KR 分離株を接種したキャベツ(非感染)
- E : TuMV-KC 分離株に感染したキャベツの淡いモザイク症状
- F : TuMV-JO 分離株を接種したキャベツ(非感染)

(2) TuMV の精製と電子顕微鏡による観察

Choi ら (1977) の方法に準じ、TuMV の精製を行った。塩化リチウムによる密度勾配遠心により、TuMV 粒子が明確なバンドとして確認された。ウイルス濃度は吸光係数 $E_{260}=3$ から算出した。その結果、1 回の純化で感染コカブ 100g から約 10 mg のウイルスが回収された。また、分離株間で収量に差は認められなかった。

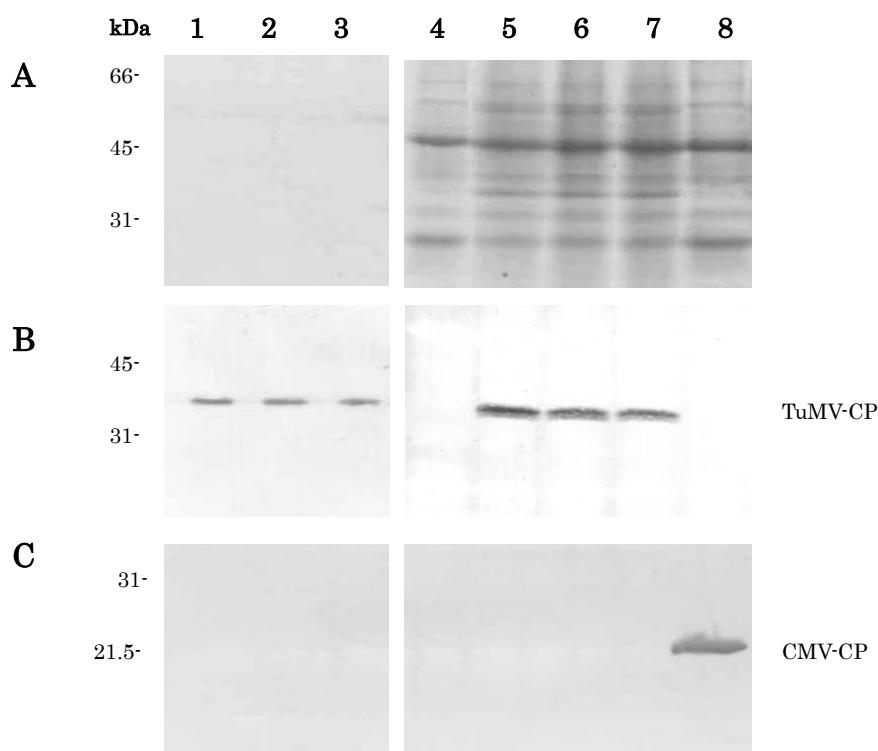
JO、KR 及び KC を感染させたコカブから純化したウイルス粒子及び感染植物を DN 法により電子顕微鏡観察したところ、いずれも Potyvirus に特有のひも状のウイルス粒子が確認された (第 6 図)。



第 6 図 DN 法により観察されるウイルス粒子.
スケールは 100 nm を表す。

(3) 血清反応試験

TuMV-JO 抗体を用い、ウエスタンブロットにより血清反応を調べた。その結果、TuMV-JO、KR 及び KC の各純化試料 (第 7 図 B : lanes 1~3) 及びこれらの分離株を *N.benthamiana* に汁液接種し、モザイク症状を示した上葉 (lanes 5~7) はいずれも TuMV 抗体と明確な反応を示すとともに、外被タンパク質のサイズにも差は認められなかった。また、これらの試料はいずれも CMV 抗体とは反応しなかった (第 7 図 C)。



第 7 図 純化試料及びウイルス感染植物のウエスタンブロット解析.

A : SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動像. B : TuMV 抗体によるウエスタンブロット解析. C : CMV 抗体によるウエスタンブロット解析.

1, TuMV-JO の純化試料; 2, TuMV-KR の純化試料; 3, TuMV-KC の純化試料; 4, *N. benthamiana* 健全葉; 5, TuMV-JO に感染した *N. benthamiana*; 6, TuMV-KR に感染した *N. benthamiana*; 7, TuMV-KC に感染した *N. benthamiana*; 8, CMV-Y に感染した *N. benthamiana*

(4) TuMV 分離株間における塩基配列の比較

RT-PCR の結果、想定される 1.2 knt の位置に明確な増幅 DNA が検出された。JO、KR 及び KC のそれぞれについて得られた PCR 産物をクローニングすることにより pT7TuJO、pT7TuKR 及び pT7TuKC を構築した。これらのプラスミドについて塩基配列の解析を行った結果、JO、KR 及び KC は TuMV-UK1 とそれぞれ 96.5%、89.8%及び 97.3%の相同性を示した。次に JO、KR 及び KC の塩基配列を NIb 領域と CP 領域について比較したところ、NIb 領域は JO と KR では 85.3%、JO と KC では 95.0%、KR と KC では 85.9%の相同性を示した。また、CP 領域については JO と KR では 87.9%、JO と KC では 96.7%、KR と KC では 88.8%を示した (第 4 表)。

第 4 表 TuMV 分離株間における CP 及び NIb 遺伝子の相同性

TuMV 分離株	JO	KR	KC
JO: CP	100	87.9	96.7
NIb	100	85.3	95.0
KR: CP		100	88.8
NIb		100	85.9
KC: CP			100
NIb			100

GenBank 登録番号. JO: AF312909、KR: AF312910、
KC: AF312911

4. 考察

アブラナ科野菜に感染するウイルスには TuMV のほかに CMV があり、まれにカリフラワーモザイクウイルス (cauliflower mosaic virus, CaMV) が検出される。栃原 (1965) は、日本各地のダイコンからモザイク症状株を収集し、ウイルスを同定したところ、その多くは TuMV 単独か、または TuMV と CMV の混合感染であった。また、植草ら (2003) は神奈川県内ダイコンのえそ症状株を TuMV と CMV を同時に検出できるマルチプレックス PCR により検定したところ、全ての個体から TuMV が検出されたほか、約 30% の個体から CMV が同時に検出された。これらの結果から、本研究においてダイコン及びキャベツのモザイク症状から *C. amaranticolor* の局部病斑を経て分離したウイルスには TuMV の他、CMV が混在していた可能性が考えられた。しかし TuMV の病斑と CMV の *C. amaranticolor* における局部病斑は明確に識別が可能であり (栃原, 1965)、純化ウイルスの粒子形態がひも状であることや、全身感染植物を用いたウエスタンブロット解析でも CMV 抗体には反応しなかったことから、TuMV のみが分離されたものと考えられた。一方、汁液接種試験の結果、JO、KR、KC の病原性の違いはダイコン及びキャベツにおいてのみ認められ、JO 及び KR はダイコンに感染したが KC は感染せず、逆に KC はキャベツに感染したがダイコンには感染しなかった。このことから、これら分離株の宿主範囲を基準にすると、JO と KR の方が KC よりも近縁であると考えられた。また、KR 及び KC の病徴がそれぞれダイコン及びキャベツで再現されたことは、本実験で採集した植物の圃場における病徴は、主に TuMV によるものであることを示している。

本研究で得られた TuMV 分離株における CP を含む 3'末端側部分塩基配列を比較したところ、JO、KR 及び KC は既報の TuMV-UK1 とそれぞれ 96.5%、89.8%、97.5% と高い相同性を示し、これらの分離株はいずれも TuMV であることが明らかとなった。次に JO、KR、KC の塩基配列について、NIb 領域と CP 領域に分けて比較したところ、NIb 領域については JO と KR では 85.3%、JO と KC では 95.0%、KR と KC では 85.9% であった。また、CP 領域については JO と KR では 87.9%、JO と KC では 96.7%、KR と KC では 88.8% であった (第 4 表)。CP 遺伝子の相同性を見ると、JO と KC の相同性は 96.7% であり、JO と KR の相同性 (87.9%) よりも高い。NIb 遺伝子についても同様に、JO と KC 間の相同性の方が JO と KR 間の相同性よりも高くなっている。このように CP と NIb に関してはダイコン及びキャベツに対する病原性と塩基配列の相同性には相関関係が認められなかった。これらの結果から、TuMV のダイコン及びキャベツに対する病原性の違いに CP や NIb は関与していないことが示唆され、病原性の差異は CP や NIb 以外の因子によるものと推測された。

感染性 cDNA クローンを用いた組み換え実験において、TuMV の病原性は P3 遺伝子によって決定されることが示されている (Jenner et al, 2003; Suehiro et al, 2004)。また、同じ Potyvirus に属する PPV では、HC-Pro 遺伝子の変異が病原性などの性質に関与していることが報告されている (González et al, 2005)。ウイルスの分類は、病原性や血清関係、塩基配列を基に行われているが、特に病原性に関与する遺伝子を特定し、ウイルスの系統診断に用いていくことは農業生産現場におけるウイルスを同定していく上で極めて重要であり、このような観点からウイルスの塩基配列と病原性の解析結果を用いていくことはウイルスの遺伝子診断を行う上でも有効と考えられる。

第3章 TuMV ゲノム由来の遺伝子を導入した形質転換植物の作出と TuMV 抵抗性

1. 緒言

TuMV を防除するために抵抗性品種の育種が進められており、ナタネやハクサイなどで抵抗性遺伝子が同定され、抵抗性品種の育成に利用されている (Provvidenti, 1980; Tomlinson, 1982; Yoon et al., 1993; Walsh et al., 1999)。これらの遺伝資源の中には TuMV が感染・増殖しない高度抵抗性 (免疫性) の遺伝子を持つものが存在するが、その抵抗性は TuMV の系統特異的であり、ウイルス遺伝子の変異によって抵抗性が打破されることが報告されている (Walsh et al, 1999; Jenner et al, 2002; Tan et al, 2005)。また、ダイコンでは TuMV 抵抗性に品種間差が存在し、みの早生系ダイコンが他の品種よりも強く、聖護院系がこれに次ぎ、宮重系は極めて弱い (馴松ら 1953)。清水ら (1963) はダイコン 65 種のウイルス病抵抗性を 3 年間にわたり調査し、「晩生みの」や「高倉」など 11 品種が強抵抗性であるとし、感受性品種である「大丸聖護院」と「高倉」を交配した後代を選抜して抵抗性系統を得ている。しかしこれらの品種では TuMV が感染した際の病徴は弱いものの、ウイルスは増殖する。

植物ウイルスの遺伝子は一般に、粒子を構成する外被タンパク質 (CP) 遺伝子や遺伝子の複製に関与する複製酵素 (RdRp) 遺伝子の他、ウイルスの細胞間または長距離移行に関与する移行タンパク質 (MP) などをコードしている。これらの遺伝子を植物に導入することでウイルス抵抗性を付与できることが知られており、抵抗性植物を得るための遺伝子としては CP の他、RdRp や MP をコードする遺伝子、及びこれらのアンチセンス遺伝子などがある。また、このような形質転換植物における抵抗性の機構は、導入遺伝子から翻訳されたタンパク質が関与する protein-mediated resistance と、転写された RNA が関与する RNA mediated resistance に大別されてきた (Beachy, 1997; Dougherty and Parks, 1995; Lomonosoff, 1995)。TMV の場合、RdRp である 54K タンパク質遺伝子を導入したタバコの抵抗性には翻訳産物が必要であり、54K の約 20% しか翻訳されない遺伝子を導入したタバコでは抵抗性を示さないことから、そのメカニズムは protein mediated resistance と考えられた (Carr et al., 1992)。また、アルファルファモザイクウイルス (alfalfa mosaic virus, AMV) の RdRp 導入植物でも抵抗性には翻訳産物が必要とされている (Palukaitis et al., 1997)。TMV の MP である 30K タンパク質あるいはシロクロバモザイクウイルス (white clover mosaic virus, WCIMV) の MP の一つである 13K タンパク質に変異を導入した cDNA をタバコに形質転換したところ、複数種のウイルスに対する抵抗性が付与されている (Cooper et al., 1995; Beck et al., 1994)。一方、CMV の RdRp 遺伝子導入植物の抵抗性や、ササゲモザイクウイルス (cowpea mosaic virus, CPMV) の MP 遺伝子導入植物における抵抗性は、RNA mediated resistance によることが報告されている (Sijen et al., 1996)。

Potyvirus の遺伝子を導入した形質転換植物には、PVY やエンドウ種子伝染モザイクウイルス (pea seed-borne mosaic virus, PSbMV) の NIb 遺伝子を導入したタバコやエンドウ (Audy et al., 1994; Jones et al., 1998)、TEV の VPg 遺伝子を導入したタバコ (Swaney et al., 1995) 等がある。また、PRSV の CP 遺伝子を導入したパパイヤなど一部の作物ではすでに実用化されている (Prins et al., 2008; Fuchs and Gonsalves, 2008)。TEV の CP 遺伝子を導入したタバコでは、ウイルスの感染によ

って RNA レベルでの抵抗性が誘導される事例が報告されている。この場合、TEV の接種により感染初期に展開した上葉では激しい病徴が現れるが、その後展開する上葉では病徴が軽減し、さらに見かけ上健全な葉が展開してくる。無病徴の上葉には TEV がほとんど検出されず、さらなる TEV 感染に対して強い抵抗性を示す。このような回復型抵抗性はウイルス感染によって RNA レベルでの抵抗性が誘導されたものであり、リカバリーと名付けられている (Lindbo et al., 1993; Dougherty et al., 1994)。このように多くのウイルスと植物の組み合わせでウイルスのゲノム遺伝子を導入した形質転換植物におけるウイルス抵抗性について研究が進められ、その大部分が RNA-mediated resistance によると考えられている。

TuMV 遺伝子を導入した形質転換植物については、Jan ら (1999) が CP 遺伝子を導入した *N. benthamiana* を作出し、TuMV 抵抗性植物を得ている。この実験では 29 の形質転換系統が作出され、うち半数の系統で抵抗性個体が獲得されている。抵抗性個体の特徴としては核での CP mRNA の転写はされているが、細胞質における mRNA の検出レベルが低いことから転写後の RNA レベルでの抵抗性、すなわち PTGS であることが推察されている。しかし CP 翻訳産物の有無と抵抗性について比較した実験は行われず、抵抗性検定に用いられた TuMV は単一の系統である。また、TuMV がコードする各種ゲノム遺伝子を植物に導入し、導入遺伝子の種類による抵抗性レベルや抵抗性個体を獲得するための効率を相対的に比較した研究事例はない。

さらに、ウイルス遺伝子を導入した形質転換植物における抵抗性は特定のウイルス系統に対して特異的である場合がある。TEV の CP 遺伝子を導入したタバコでは、複数系統の TEV に対して抵抗性を示すが、CP 遺伝子の相同性が約 60% の PVY には感受性である (Lindbo et al., 1993)。PVX の複製酵素遺伝子 (RdRp) を導入したタバコが PVX 抵抗性を示すには、導入遺伝子と PVX 遺伝子間に 88% 以上の相同性が必要である (Mueller et al., 1995)。PSbMV の NIb 遺伝子を導入したエンドウでは、PSbMV に対して抵抗性を示すのは導入遺伝子との間に 89% 以上の相同性がある場合である (Jones et al., 1998)。また、groundnut rosette virus (GRV) のサテライト RNA を導入した *N. benthamiana* のウイルス抵抗性は、87% 以上の相同性がある場合に維持される (Taliensky et al., 1998)。このように、CP などのウイルス遺伝子を導入した形質転換植物における翻訳産物の必要性や、得られた形質転換植物がどの範囲のウイルス系統に対して抵抗性を示すのかは明確ではない。

植物からの有用遺伝子の単離や、遺伝子の機能を調べて実用作物に応用するためにシロイヌナズナやタバコなどのモデル植物が利用されている。シロイヌナズナは形質転換体の作製が容易であり、TuMV に対しても感受性で、感染した植物では一般に激しい病徴を示すことが知られている (Sanchez et al., 1998; Martin et al., 1999)。また、タバコの近縁種である *N. benthamiana* は TMV や CMV、PVY など多くのウイルスに感受性が高く、TuMV に感染した際も極めて激しい病徴を示す。さらに、植物体の大きさが中程度であるためサンプリングしやすいだけでなく接ぎ木も可能で、リーフディスク法による形質転換法も確立されていることから、ウイルス抵抗性の研究に広く用いられている。そこで本章では、TuMV の CP 遺伝子をシロイヌナズナに導入した形質転換体を作成し、CP 翻訳産物と TuMV 抵抗性の関連及び抵抗性個体の特性を解析した。また、世界各地から収集され、CP の塩基配列の相同性及び病原性の異なる多様な TuMV を複数の形質転換系統及びその後代に接

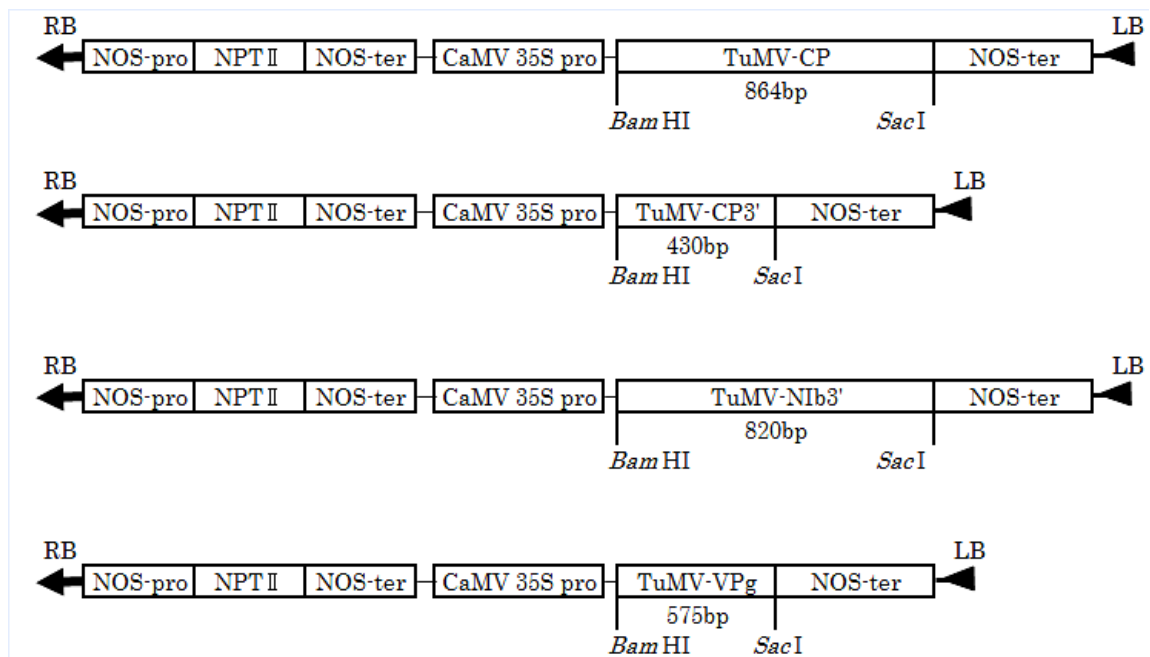
種し、反応を調べた。さらに、TuMVの中でも保存性が高い領域を含むため、多くのTuMV系統に対する抵抗性個体の獲得が期待できるCP遺伝子の3'末端側部分塩基配列、Nib遺伝子の3'末端側部分塩基配列及びVPg遺伝子を導入するコンストラクトを構築し、*N. benthamiana*に導入した形質転換を作出して抵抗性レベルや抵抗性個体の獲得効率等について比較した。

2. 材料及び方法

(1) TuMV 遺伝子の単離とバイナリーベクターの構築

TuMV-JOのCP遺伝子全長867 ntをPCRによりクローニングした。第2章で単離したTuMV-JO遺伝子を含むプラスミドpT7TuJOを鋳型とし、プライマーにはフォワードプライマーとしてCPF-1 (5'-GGATCCAACAATGGCAGGTGAGATGCTTGGT-3') 及びリバースプライマーとしてCPR-1 (5'-GAGCTCTCATAACCCCTTAACGCC-3')を用いた。この他にTuMV遺伝子の各種領域を植物に導入し、抵抗性レベル等を比較検討する目的で、CPの3'末端側430 nt(以下CP3')、Nib遺伝子の3'末端側820 nt(以下Nib3')、VPg遺伝子全長575 nt(以下VPg)をRT-PCRによりクローニングした。PCRに用いたプライマーは、CP3'についてはCPF-2 (GGATCCTGGAATTCCCGATCAAACCG) 及びCPR-1 (GAGCTCTCATAACCCCTTAACGCC)を、Nib3'についてはNibF1 (GGATCCTATTGCGATGCTGATGGCTC) 及びNibR1 (GAGCTCTTACTGGTGATAAACACAAGCTT)を、また、VPgについてはVPgF1 (GGATCCATGGCGAAAGGCAAGAGGCAAAG) 及びVPgR1 (GAGCTCTTACTCGTGGTCCACTGGGGACGA)を用いた。5'末端側プライマーには制限酵素サイトとしてBamHI部位を、また、3'末端側プライマーにはSacI部位を付加した(配列下線部)。PCRの反応条件は熱変性94°C、30秒、アニーリング49°C、30秒、伸長反応72°C、30秒を30サイクル行った。PCR増幅断片はいずれも、pT7Blue-T-Vectorにクローニング後、ABI3130 DNAシーケンサーにより塩基配列を決定し、目的とする遺伝子が導入できていることを確認した。クローニングした各遺伝子断片を含むプラスミドを制限酵素BamHI及びSacIで処理して各遺伝子断片をゲル精製した。各遺伝子をバイナリーベクターpBI121(Clontech)の35Sプロモーター下流に連結されているβ-グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子と置換し、遺伝子導入用のコンストラクトとしてpBI-TuCP、pBI-CP3'、pBI-Nib3'及びpBI-VPgを構築した(第8図)。

これらのコンストラクトはトリペアレンタルメイティング法(Ditta et al., 1980)によりアグロバクテリウムに移行させた。まず、構築したコンストラクト及びpRK2013をそれぞれ導入した大腸菌DH5αとアグロバクテリウムC58C1株をLB培地で共存培養した。次にカナマイシンを含むAB培地で画線培養を数回繰り返すことにより大腸菌を除去した。pBI-TuCPがアグロバクテリウムへ移行されていることは大腸菌での手法に準じ、ミニプレップによりプラスミド抽出後、電気泳動して確認した。



第 8 図 バイナリーベクターpBI121 を基に構築したコンストラクトの構造.

NOS-pro : ノパリンシンセターゼプロモーター、NPTII : カナマイシン抵抗性遺伝子、
 NOS-ter : ノパリンシンセターゼターミネーター、CaMV 35S pro : カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター、TuMV : カブモザイクウイルス、CP : 外被タンパク質
 遺伝子、Nib : 複製酵素遺伝子、VPg : ゲノム結合タンパク質遺伝子

(2) シロイヌナズナ形質転換体の作出

シロイヌナズナの形質転換は減圧浸潤法により行った (Bechtold et al., 1993)。まず、MS 基本培地 (Murashige and Skoog, 1962) で作製した寒天培地上にシロイヌナズナ (Col-0) を無菌は種し、発芽 1 週間後の植物体をオアシス園芸培地に移植、液肥(ハイポネクス)を用いて水耕栽培した。移植後の抽苔部を摘心することにより側枝を誘導し、摘心後に伸長してきた側枝上の開花・結実が開始した時点で花及び莢を切除し、アグロバクテリウム菌液への浸潤処理に用いた。アグロバクテリウム菌液は以下の通り準備した。まず、pBI-TuCP を含むアグロバクテリウムを 1,000 ml の LB 培地 (リファンピシン 50 µg/ml 含む) で 2 日間大量培養した。次に 8,000 ×g で 10 分間遠心することにより集菌し、ペレットを浸潤用培地に懸濁し、tween20 を加えた。アグロバクテリウム懸濁液を入れたビーカーを減圧デシケーターに静置後、オアシス園芸培地で栽培したシロイヌナズナを逆さまにして浸し、400 mmHg まで減圧し、10 分間静置した。減圧を解除し、オアシス内の余分な懸濁液を除去後、トレイ内に静置し、数日かけて順化した。約一ヶ月後に乾燥してきた莢から順次採種を行った。得られた T₁ 種子を 70%エタノールで 1 分間及び次亜塩素酸ナトリウムで 5 分間攪拌後、滅菌水で 5 回洗浄することにより滅菌し、カナマイシン (25µg/ml) 及びクラフォラン (150 µg/ml) を含む MS 寒天培地に溶解した 1%低融点アガロースで均一に広がるようにして播種した。1 ヶ月後にカナマイシン耐性を示している個体 (T₁ 世代) を順次鉢上げし、22°C、12 時間日長のグロースチャンバーで育成して個体別に T₂ 世代 (T₂ 系統) を採種した。

(3) *N. benthamiana* 形質転換体の作出

N. benthamiana の形質転換はリーフディスク法 (Horsch et al., 1985) により行った。*N. benthamiana* の葉を 70%エタノールで 1 分及び次亜塩素酸ナトリウムで 5 分間攪拌後、滅菌水で洗浄した。シャーレ内のアグロバクテリウム菌液中で 1 cm 程度にメスで切断し、MS-NB 培地 (1 µg/ml 6-ベンジルアミノプリン, 0.1 µg/ml ナフタレン酢酸含む) に置床して共存培養した。3 日後にクラフォランを含む MS-NB 培地に移植し、アグロバクテリウムを除菌するとともにカルス形成を促進した。10 日後にカナマイシン (25 µg/ml) 及びクラフォラン (150 µg/ml) を含む MS-NB 培地に移植し、カナマイシン耐性を選抜マーカーにして形質転換体の選抜を進めた。カルスから形成された不定芽をさらにカナマイシン及びクラフォランを含む MS 培地に移植して選抜を進めた。再分化して発根し、植物体が正常に生育したものを T₀ 世代として順次鉢上げし、25°C、12 時間日長のグロースチャンバーで育成した。各形質転換体から次世代を採種し、カナマイシン (25 µg/l) を含む MS 培地に無菌播種し、カナマイシン耐性をマーカーにして形質転換体 T₁ 世代を選抜した。

(4) 汁液接種試験

TuMV-JO に感染したコカブのモザイク葉を接種源とし、形質転換 T₁ 及び T₂ 系統各 8~20 個体に汁液接種した。また、抵抗性個体が得られた系統の一部については、自家受精により次世代を採種・育成し、T₃ 及び T₄ 系統への接種を行い、TuMV に対する反応を調べた。

TuMV 抵抗性を示したシロイヌナズナにおいて、病原性や導入した CP 遺伝子とは塩基配列の相同

性が異なる TuMV に対する反応を見るため、接種試験を行った。供試材料としては、Ohshima ら (2002) が世界各地から収集して塩基配列を決定し、病原性との関連によって分類された 4 つのグループに属する典型的な TuMV の中から 17 株を選び (第 7 表)、シロイヌナズナ形質転換体に接種した。

(5) PCR

TuMV-CP 遺伝子を導入した形質転換植物における導入遺伝子は TuMV-CP 遺伝子の内部に設計した検出プライマーによる PCR により検定した。検出プライマーには CP 遺伝子内部に設計した CPU1 (5'-TTAACAGACGAGCAAAAAGCA-3') 及び CPL1 (5'-TCCATCCAAGCCGAACAAAT-3') を用い、サザンブロット解析で記載する方法により形質転換体から抽出した全 DNA を鋳型に PCR を行った。また、CP3'、NIb3' 及び VPg 遺伝子の検出については導入遺伝子の増幅に用いたプライマーによる PCR により行った。PCR の反応条件は熱変性 94°C、30 秒、アニーリング 49°C、30 秒、伸長反応 72°C、30 秒を 30 サイクルとした。

(6) RT-PCR

汁液接種した植物における TuMV 感染の有無は病徴を観察するとともに、RT-PCR により検定した。RT-PCR のプライマーには TuMV-CP 遺伝子を導入した植物では導入遺伝子に由来する mRNA と、接種した TuMV の RNA を区別するため、NIb 遺伝子を検出できるプライマーとして作製した NIbF2 (GACAAGTTAACTCACGAGAT) 及び NIbR1 を用いて行った。また、NIb3' 遺伝子を導入した植物では CPU1 及び CPL1 を用いた。ノーザンブロット解析で記載する手法により全 RNA を抽出後、RNA LA PCR キット (TaKaRa) を使用し、リバースプライマーにより 49°C、30 分間逆転写を行った後、フォワードプライマーを加えて PCR を行なった。PCR の反応条件は、熱変性 94°C、30 秒、アニーリング反応 52°C、30 秒、伸長反応 72°C、30 秒で 30 サイクル反応させた。

(7) サザンブロット解析

全 DNA を CTAB 法により抽出した。まず、0.1~1 g の葉を -80°C のフリーザー内で乳鉢とともに凍結後、磨砕してパウダー状にした。乳鉢にサンプルの 3 倍量の CTAB 抽出液を加えて混合し、溶解後、マイクロチューブまたは 15 ml 遠心チューブに回収した。1/2 容量の TE 飽和フェノール及びクロロフォルムを加えて転倒混和し、15,000 × g で 10 分間遠心した。上層を回収し、等量のクロロフォルム・イソアミルアルコールを加えて転倒混和し、15,000 × g で 10 分間遠心した。上層を回収し、等量のイソプロパノールまたは 2.5 倍量の 99 % エタノールを加えて混合し、15,000 × g で 15 分間遠心して DNA を沈殿させた。70 % エタノール洗浄を行い、10 分間風乾後、RNase を含む TE に溶解して DNA サンプルとした。分光光度計 (Beckman) により DNA の濃度を測定し、5~10 µg のゲノム DNA を制限酵素で消化した。制限酵素処理後の DNA をフェノール・クロロフォルム抽出により精製し、エタノール沈殿後、10 µl の TE に再度溶解し、1% アガロースゲル電気泳動後、バキュームブロットング装置 (Bio-Rad) を用いてナイロンメンブレン (Roche) に DNA を転写した。

メンブレンに UV を照射して DNA を固定し、 $2\times$ SSC で洗浄後、ハイブリオーブを用いて DIG バッファーによりプレハイブリダイゼーションを行った。その後、対象とする DNA 断片を DIG 標識したプローブを用いて一晩ハイブリダイゼーションを行った。プローブの合成は DIG PCR プローブ合成キット (Roche) を用い、各遺伝子をクローニングしたプラスミドを鋳型にして導入遺伝子に相当するプローブを合成した。プロトコールに従い、 0.1% SDS を含む $2\times$ SSC 及び $0.2\times$ SSC による洗浄、ブロッキング及び AP 標識 DIG 抗体処理を行い、メンブレンの洗浄後、化学発光検出フィルム(Roche)に 5~15 分間露光してシグナルを検出した。

(8) ノーザンブロット解析

全 RNA の抽出には Easyprep RNA 抽出キット (TaKaRa) を用いた。0.1~1g の葉を -80°C のフリーザー内で乳鉢とともに凍結後、磨砕してパウダー状にした。乳鉢にサンプルの 10 倍量の Easyprep RNA 抽出液を加えて混合し、溶解後、マイクロチューブまたは 15ml 遠心チューブに回収した。1/5 容量のクロロフォルムを加えて転倒混和し、 $10,000\sim 15,000 \times \text{g}$ で 15 分間遠心した。上層を回収し、1/2 容量の DEPC 処理水を加えて転倒混和後、等量のイソプロパノールを加えて混合し、 $10,000\sim 15,000 \times \text{g}$ で 15 分間遠心して RNA を沈殿させた。70%エタノールでリンスを行い、10 分間風乾後、DEPC 処理水に溶解して RNA サンプルとした。

抽出した全 RNA 5 μg を、 1% アガロースを含む MOPS 変性ゲルで 50 V、1.5 時間電気泳動した。泳動後のゲルを $20\times$ SSC に 10 分間浸した後、バキュームブロットング装置を用いて RNA をナイロンメンブレンに転写した。メンブレンに UV を照射して RNA を固定し、 $2\times$ SSC で洗浄後、ハイブリオーブを用いて DIG ハイブリバッファーによりプレハイブリダイゼーションを行った。RNA プローブの作製には DIG RNA プローブ合成キット (Roche) を用い、プロトコールに従って対象とする mRNA のアンチセンス RNA プローブを合成し、一晩ハイブリダイゼーションを行った。DIG のプロトコールに従い、 0.1% SDS を含む $2\times$ SSC 及び $0.2\times$ SSC による洗浄、ブロッキング及び AP 標識 DIG 抗体処理、メンブレンの洗浄後、化学発光検出フィルムに 5~15 分間露光してシグナルを検出した。

(9) ウェスタンブロット解析

導入遺伝子由来の TuMV-CP 発現についてはウェスタンブロットにより解析した。まず、0.1g の葉を乳鉢ごと凍らせて磨砕し、200 μl の SDS-サンプルバッファーで溶解後、マイクロチューブに回収した。 $10,000 \times \text{g}$ で 5 分間遠心した上清をサンプルとし、10 μl を SDS-PAGE に供試した。分離したタンパク質のメンブレンへの転写、TuMV 抗体との反応及びシグナルの検出は第 2 章に記載した方法により行った。

(10) siRNA の検出

全 RNA の抽出はノーザンブロット解析と同様に行った。次に低分子量 RNA を分画し、サンプルを調整した。まず、抽出した全 RNA に 2 倍量の 8M LiCl を加えて混合し、氷上に 30 分以上静置し

た。次に 15,000 ×g で 15 分間遠心分離して得た上清に 3 倍量のエタノールを加え、15,000 ×g で 15 分間遠心して低分子量 RNA を含むペレットを得た。ペレットを RNA 抽出に用いた薬 0.1g あたり 10 µl の DEPC 処理水に溶解し、RNA サンプルとした。siRNA の検出は Hamilton と Baulcombe の方法 (1999 年 に従って行った。RNA サンプルに等量のローディングバッファーを加え、70°C で 5 分間熱変性した。サンプルを 15%ポリアクリルアミドスラブゲル(15% アクリルアミド, 0.6% ビスアクリルアミド, 7M 尿素, TBE バッファー (50 mM トリス, 41.5 mM ホウ酸, 0.5 mM EDTA) で電気泳動後、トランスブロット SD セルを用いてナイロンメンブレンに転写した。TuMV-CP をクローニングした pT7 ベクターを制限酵素処理して直鎖化後、DIG RNA ラベリングキット (Roche) のプロトコールに従ってセンス鎖の RNA プローブを合成し、ハイブリダイゼーションに用いた。ハイブリダイゼーション後のシグナルの検出はノーザンブロットと同様の手法により行った。

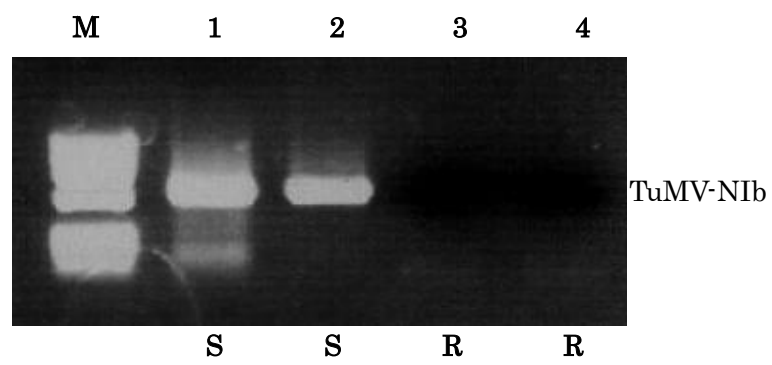
3. 結果

(1) シロイヌナズナ形質転換体の作出と TuMV 抵抗性

シロイヌナズナに TuMV-CP 遺伝子を導入したところ、23 のカナマイシン耐性個体(T₁ 世代)が得られた。この T₁ 世代から DNA を抽出し、PCR 法で TuMV-CP 遺伝子の存在を調べた結果、全ての個体から TuMV-CP 遺伝子が検出され、目的とする形質転換体 (*AtCP*) が得られた。*AtCP* の T₁ 世代を自殖し、T₂ 世代を採種した。これらの種子をカナマイシンを含む MS 培地に無菌播種し、23 系統の T₂ 世代を選抜育成した。各形質転換系統の T₂ 世代を育成後、TuMV を汁液接種して抵抗性検定を行った (第 5 表)。その結果、多くの個体は非形質転換体と同様の病徴を示し、これらの個体では RT-PCR により TuMV が検出され、TuMV 感受性と判断されたが (第 9 図)、TuMV 接種後も無病徴で完全な抵抗性を示すもの及び非形質転換体と比較すると発病が遅れる病徴遅延型の反応を示す個体が確認された (第 10 図)。なお、本研究では病徴遅延型の反応についてはウイルスの感染・増殖が確認でき、病徴を示すことから感受性個体として評価した。さらに、T₂ 世代の過半数が抵抗性であった *AtCP*4、*AtCP*11、*AtCP*20 及び *AtCP*23 の抵抗性個体から T₃ 世代を選抜・育成し、TuMV 抵抗性検定を行った。また、T₂ 世代の全てが感受性であった *AtCP*2、*AtCP* 5、*AtCP* 8 及び *AtCP* 16 の T₂ 個体から T₃ 世代を採種・育成し、TuMV に対する反応を調べた。その結果、*AtCP*4 の T₃ 世代は抵抗性/感受性が分離するか、または TuMV 感受性であり、さらに分離した系統の後代の形質も分離した (第 6 表)。また、*AtCP*11、*AtCP*20 及び *AtCP*23 の T₃ 世代では、多くの系統が TuMV 抵抗性を示すものの、その形質は分離した。しかし全ての個体が抵抗性を示す系統 (*AtCP*112-R1、*AtCP*202-R1、*AtCP*232-R1) が確認された。また、これらの系統から T₄ 及び T₅ 世代を育成し、TuMV 抵抗性検定を行ったところ、全ての個体が抵抗性であった。感受性系統である *AtCP*22-S1、*AtCP*52-S1、*AtCP*82-S1 及び *AtCP*162-S1 については T₃ 世代だけでなく、その後代である T₄ 及び T₅ 世代についても全ての個体が TuMV 感受性であった (第 6 表)。

第 5 表 TuMV-CP 遺伝子を導入したシロイヌナズナ形質転換体
T₂ 世代の TuMV に対する反応

T ₁ 植物	T ₂ 世代の TuMV に対する反応		抵抗性個体 (%)
	抵抗性	感受性	
<i>AtCP1</i>	0	24	0
<i>AtCP2</i>	0	24	0
<i>AtCP3</i>	0	24	0
<i>AtCP4</i>	12	12	50
<i>AtCP5</i>	0	24	0
<i>AtCP6</i>	0	24	0
<i>AtCP7</i>	8	16	33
<i>AtCP8</i>	0	24	0
<i>AtCP9</i>	4	20	17
<i>AtCP10</i>	0	24	0
<i>AtCP11</i>	18	6	75
<i>AtCP12</i>	0	24	0
<i>AtCP13</i>	0	24	0
<i>AtCP14</i>	0	24	0
<i>AtCP15</i>	5	19	21
<i>AtCP16</i>	0	24	0
<i>AtCP17</i>	4	20	17
<i>AtCP18</i>	0	24	0
<i>AtCP19</i>	0	24	0
<i>AtCP20</i>	12	12	50
<i>AtCP21</i>	0	24	0
<i>AtCP22</i>	0	24	0
<i>AtCP23</i>	18	6	75
非形質転換体	0	10	0



第9図 TuMV-CPを導入した形質転換体からのRT-PCRによるTuMVの検出.
M, 分子量マーカー; 1, *AtCP2*; 2, *AtCP5*; 3, *AtCP11*; 4, *AtCP20*
表現型 R:抵抗性, S:感受性



第 10 図 シロイヌナズナ非形質転換体(A)及び形質転換体(B~D)の TuMV に対する反応.
A, D : 感受性、B : 抵抗性、C : 病徴遅延

第 6 表 TuMV-CP 遺伝子を導入したシロイヌナズナ T₂ 世代及び T₃~T₅ 世代における TuMV 抵抗性

T ₁ 系統	T ₂ 世代の反応		T ₂ 系統	T ₃ 世代の反応		T ₄ 及び T ₅ 世代の反応
	抵抗性	感受性		抵抗性	感受性	
<i>At</i> CP4	12	12	<i>At</i> CP42 -R1	6	4	分離
			-R2	2	8	分離
			-R3	5	5	分離
			-S1	0	10	全て感受性
<i>At</i> CP11	18	6	<i>At</i> CP112-R1	10	0	全て抵抗性
			-R2	8	2	NT
			-R3	5	5	NT
<i>At</i> CP20	12	12	<i>At</i> CP202-R1	10	0	全て抵抗性
			-R2	6	4	NT
			-R3	2	8	NT
<i>At</i> CP23	18	6	<i>At</i> CP232-R1	10	0	全て抵抗性
			-R2	2	8	NT
			-R3	7	3	NT
<i>At</i> CP2	0	24	<i>At</i> CP22 -S1	0	10	全て感受性
<i>At</i> CP5	0	24	<i>At</i> CP52 -S1	0	10	全て感受性
<i>At</i> CP8	0	24	<i>At</i> CP82 -S1	0	10	全て感受性
<i>At</i> CP16	0	24	<i>At</i> CP162-S1	0	10	全て感受性

NT : 無試験

(2) シロイヌナズナ形質転換体の TuMV 分離株に対する反応

本実験で *AtCP* への接種試験に供試した TuMV 分離株を第 7 表に示す。これらの分離株を *AtCP112-R1*、*AtCP202-R1*、*AtCP232-R1* 及び非形質転換体 (Col-0) に接種したところ、全ての分離株が Col-0 に感染したのに対し、形質転換体にはいずれのウイルス分離株も感染しなかった (第 8 表)。供試した TuMV の Col-0 に対する病徴は一部の分離株間で異なり、Cal1 分離株や BZ1 分離株は特に激しいモザイク・萎縮症状を示し、接種 3~4 週間後には植物が枯死したのに対し、CHN12 では UK1 分離株など他の分離株と比較するとやや淡いモザイク・萎縮症状を示した (第 10 図)。

第7表 供試した TuMV 分離株と CP 遺伝子及び CP 遺伝子 3'末端側 380nt の相同性特性

TuMV 分離株	CP 遺伝子の相同性(%)		分離国	分離宿主	グループ ^{b)}
	CP 全長	3'側 380nt			
JO ^{a)}	100	100	Japan	<i>Brassica campestris</i>	world-B
2J	97.0	100	Japan	<i>B. pekinensis</i>	world-B
59J	90.6	100	Japan	<i>Raphanus sativus</i>	Asian-BR
A102/11	88.8	96.6	Italy	<i>Anemone coronaria</i>	basal-B
BZ1	94.0	98.2	Brazi	<i>B. oleracea</i>	world-B
Cal1	89.0	97.4	Italy	<i>Calendula officinalis</i>	basal-BR
CHN12	96.8	98.9	China	<i>B. campestris</i>	basal-BR
CP845J	88.1	96.3	Japan	<i>C. officinalis</i>	basal-BR
FD21J	90.4	98.7	Japan	<i>R. sativus</i>	Asian-BR
HRD	89.4	96.8	China	<i>R. sativus</i>	Asian-BR
IS1	86.6	95.5	Israel	<i>Allium ampeloprasum</i>	basal-B
KD32J	90.6	99.7	Japan	<i>R. sativus</i>	Asian-BR
KYD81J	87.6	96.3	Japan	<i>R. sativus</i>	basal-BR
PVO104	88.7	97.6	Germany	<i>Lactuca sativa</i>	basal-BR
RUS2	90.8	97.9	Russia	<i>B. napus</i>	world-B
SGD311J	89.7	97.9	Japan	<i>R. sativus</i>	Asian-BR
TD88J	88.9	97.9	Japan	<i>R. sativus</i>	basal-BR
UK1	96.5	98.4	UK	<i>B. napus</i>	world-B

a) 各分離株の GenBank 登録番号 : JO (AF312909), 2J (AB076504), 59J (AB076485), A102/11 (AB076521), BZ1 (AB076529), Cal1 (AB076518), CHN12 (AY090660), CP845J (AB076513), FD21J (AB076493), HRD (AB076554), IS1 (AB076522), KD32J (AB076500), PVO104 (AB076532), RUS2 (AB076527), SGD311J (AB076509), TD88J (AB076511), UK1 (AF169561).

b) グループは Ohshima ら(2002)の分類に基づく。

第 8 表 TuMV-CP 遺伝子を導入したシロイヌナズナ TuMV 抵抗性系統の
TuMV 分離株に対する反応

TuMV 分離株	TuMV 抵抗性形質転換ライン			非形質転換体(Co1-0)
	<i>At</i> CP112-R1	<i>At</i> CP202-R1	<i>At</i> CP232-R1	
JO	0/10 ^{a)}	0/10	0/10	5/5
2J	0/10	0/10	0/10	5/5
59J	0/10	0/10	0/10	5/5
A102/11	0/5	0/5	0/5	5/5
BZ1	0/7	0/10	0/10	5/5
Cal1	0/8	0/6	0/6	5/5
CHN12	0/6	0/7	0/7	5/5
CP845J	0/10	0/10	0/10	5/5
FD21J	0/10	0/10	0/10	5/5
HRD	0/10	0/10	0/10	5/5
IS1	0/7	0/7	0/7	5/5
KD32J	0/10	0/10	0/10	5/5
KYD81J	0/10	0/10	0/10	5/5
PVO104	0/5	0/5	0/5	5/5
RUS2	0/9	0/10	0/10	5/5
SGD311J	0/10	0/10	0/10	5/5
TD88J	0/10	0/10	0/10	5/5
UK1	0/7	0/7	0/7	5/5

^{a)}感染個体数/接種個体数



第 11 図 シロイヌイナズナ非形質転換体及び TuMV 抵抗性形質転換体の TuMV 分離株に対する反応。

A: Cal1 分離株に対する反応。

B: BZ1 分離株に対する反応。

C: CHN12 分離株に対する反応。

D: UK1 分離株に対する反応。

1, 非形質転換体 (Col-0); 2~4, TuMV 抵抗性形質転換ライン (*AtCP112-R1*, *AtCP202-R1*, *AtCP232-R1*).

(3) TuMV-CP 遺伝子を導入した *N. benthamiana* の TuMV に対する反応

TuMV では分離株間で CP 遺伝子の 3'末端側 380nt に高い相同性が認められることが報告されており (Ohshima et al., 2002)、TuMV-JO と接種試験に供試した 17 分離株について CP の全長と 3'末端側 380 nt 領域の相同性を比較した(第 7 表)。その結果、CP 全長の相同性については 86.6% (IS1) から 97% (2J) であり、17 分離株中 9 分離株が 90%未満であるのに対し、3'末端側領域は IS1 では 95.5%、他の分離株では多くが 97%以上であり、2 分離株については 100%一致し、高い相同性が認められた。

そこで、*N. benthamiana* にリーフディスク法で TuMV-CP 及び CP3'を導入し、各遺伝子について 20 個体のカナマイシン耐性を示す再分化個体を得た。これらの幼植物から DNA を抽出し、PCR 法により導入遺伝子の存在を調べた結果、全ての個体から目的とする遺伝子が検出された。これらの形質転換体 T₀ 世代から T₁ 世代を採種し、カナマイシンによる選抜をして育成後、TuMV 抵抗性検定に供試した。その結果、TuMV-CP を導入した形質転換体 (*NbCP*) では T₁ 世代の多くは非形質転換体と同様に TuMV 感受性であったが、抵抗性個体が多くを占める形質転換系統が認められ、*NbCP1*、*NbCP2*、*NbCP9*、*NbCP12*、*NbCP13*、*NbCP19* 及び *NbCP20* の 7 系統については供試個体の 50% 以上が TuMV 接種後も全く病徴が認められず、TuMV が検出されないことから TuMV 抵抗性系統と判断した(第 9 表)。また、*NbCP4* など、接種した系統中の一部植物に、TuMV を接種した後に展開してくる葉には病徴が見られるが、その後に展開する葉には病徴が認められなくなる回復型抵抗性(リカバリー)を示す個体が確認された(第 12 図 C)。抵抗性系統 *NbCP1*、*NbCP2* 及び *NbCP12* からそれぞれ 3 個体を選び、後代を採種し、カナマイシンによる選抜・育成後、TuMV 抵抗性検定を行った。その結果、供試個体の全てがカナマイシン耐性であり、かつ TuMV 抵抗性を示す系統 (*NbCP2-R2*、*NbCP2-R3*、*NbCP12-R1*、*NbCP12-R2*) 及び抵抗性と感受性が分離する系統 (*NbCP1-R1*、*NbCP1-R2*、*NbCP1-R3*、*NbCP2-R1*、*NbCP12-R3*) が得られた。また、全個体が抵抗性となる系統の後代について抵抗性検定を行ったところ、全ての個体が抵抗性であった。

TuMV-CP3'を導入した形質転換体 (*NbCP3'*) の TuMV に対する反応は *NbCP* とほぼ同様であり、その反応は完全な抵抗性を示す個体、リカバリーの個体及び感受性個体に分類されたが、完全な抵抗性個体が得られたのは *NbCP3'1*、*NbCP3'3*、*NbCP3'4*、*NbCP3'5*、*NbCP3'6*、*NbCP3'9*、*NbCP3'12* 及び *NbCP3'13* の 8 系統であった(第 10 表)。このうち T₁ 個体の過半数が完全な抵抗性となる系統は *NbCP3'9* の 1 系統であり、*NbCP3'3* 及び *NbCP3'10* の一部についてはリカバリーであった。*NbCP3'3* の T₁ 世代から強い抵抗性を示す 5 個体を選抜し、T₂ 世代 (*NbCP3'3-R1*~*R5*) の検定を行ったところ、*NbCP* と同様に全ての個体がカナマイシン耐性であり、かつ TuMV 抵抗性の系統 (*NbCP3'3-R1*~*R3*) と、抵抗性/感受性が分離する系統 (*NbCP3'3-R4*、*R5*) が得られた。

第9表 TuMV-CP 遺伝子を導入した *Nicotiana benthamiana* 形質転換体
T₁ 及び T₂ 世代の TuMV に対する反応

親系統	次世代のTuMVに対する反応			抵抗性 ^{a)} (%)
	抵抗性	回復型抵抗性	感受性	
T ₀ 植物				
<i>Nb</i> CP1	16		4	80
<i>Nb</i> CP2	10		10	50
<i>Nb</i> CP3	0		20	0
<i>Nb</i> CP4		10	10	0
<i>Nb</i> CP5		7	13	0
<i>Nb</i> CP6	2		18	10
<i>Nb</i> CP7		4	16	0
<i>Nb</i> CP8	0		20	0
<i>Nb</i> CP9	12	4	8	60
<i>Nb</i> CP10	0		20	0
<i>Nb</i> CP11	0		20	0
<i>Nb</i> CP12	17	1	2	85
<i>Nb</i> CP13	10	4	6	50
<i>Nb</i> CP14	0		20	0
<i>Nb</i> CP15	0		20	0
<i>Nb</i> CP16	0		20	0
<i>Nb</i> CP17	0		20	0
<i>Nb</i> CP18	0	3	17	0
<i>Nb</i> CP19	14	2	4	70
<i>Nb</i> CP20	18		2	90
T ₁ 植物				
<i>Nb</i> CP 1-R1	6		6	50
1-R2	10		4	71
1-R3	7		1	88
<i>Nb</i> CP 2-R1	3		3	50
2-R2	7		0	100
2-R3	8		0	100
<i>Nb</i> CP10-S1	0		10	0
10-S2	0		10	0
<i>Nb</i> CP12-R1	7		0	100
12-R2	8		0	100
12-R3	5		5	50

a) 抵抗性(%)は回復型抵抗性を除く抵抗性個体の割合を示す。



第 12 図 *Nicotiana benthamiana* 非形質転換体(A)及び TuMV-CP 遺伝子を導入した形質転換体 (B~D)の TuMV に対する反応.
A, B(*NbCP3*) : 感受性
C : 回復型抵抗性(*NbPC4*)
D : 抵抗性(*NbCP2*)

第 10 表 TuMV-CP3'遺伝子を導入した *Nicotiana benthamiana* 形質
 転換体 T₁ 及び T₂ 世代の TuMV に対する反応

親系統	次世代のTuMVに対する反応			抵抗性 ^{a)} (%)
	抵抗性	回復型抵抗性	感受性	
T ₀ 植物				
<i>Nb</i> CP3'1	2		18	10
<i>Nb</i> CP3'2	0		20	0
<i>Nb</i> CP3'3	8	4	8	40
<i>Nb</i> CP3'4	4		16	20
<i>Nb</i> CP3'5	2		18	10
<i>Nb</i> CP3'6	1		19	5
<i>Nb</i> CP3'7	0		20	0
<i>Nb</i> CP3'8	0		20	0
<i>Nb</i> CP3'9	10		10	50
<i>Nb</i> CP3'10	0	2	18	0
<i>Nb</i> CP3'11	0		20	0
<i>Nb</i> CP3'12	6		14	30
<i>Nb</i> CP3'13	6		14	30
<i>Nb</i> CP3'14	0		20	0
<i>Nb</i> CP3'15	0		20	0
<i>Nb</i> CP3'16	0		20	0
<i>Nb</i> CP3'17	0		20	0
<i>Nb</i> CP3'18	0		20	0
<i>Nb</i> CP3'19	0		20	0
<i>Nb</i> CP3'20	0		20	0
T ₁ 植物				
<i>Nb</i> CP3'3-R1	8		0	100
3-R2	8		0	100
3-R3	8		0	100
3-R4	6		2	75
3-R5	4		4	50

a) 抵抗性(%)は回復型抵抗性を除く抵抗性個体の割合を示す。

(4) Nib 及び VPg 遺伝子を導入した *N. benthamiana* の TuMV に対する反応

N. benthamiana に TuMV の Nib3' を導入した 20 個体の再分化個体を得た。これらの形質転換体 (*NbNib3'*) T₀ 世代から次世代 (T₁ 世代) を自家採種・育成して TuMV 抵抗性検定に供試した (第 11 表)。その結果、T₁ 世代の多くは CP 遺伝子を導入した場合と同じく TuMV 感受性であったが、*NbNib3'3*、*NbNib3'7*、*NbNib3'8*、*NbNib3'12*、*NbNib3'14* 及び *NbNib3'15* の 6 系統では 50~90% の個体が完全な抵抗性を示した。また、*NbNib3'3* 及び *NbNib3'10* の中にリカバリーを示す個体が確認された。抵抗性系統 *NbNib3'3* 及び *NbNib3'7* の T₁ 植物から後代を採種し、カナマイシンによる選抜・育成後、TuMV 抵抗性検定を行った。その結果、供試個体の全てがカナマイシン耐性であり、かつ強い TuMV 抵抗性を示す系統 (*NbNib3'3-R1~R3*, *NbNib3'7-R1~R3*) が得られた。

TuMV の VPg 遺伝子についても 20 個体の形質転換 T₀ 世代 (*NbVPg*) を獲得した。T₁ 世代の TuMV 抵抗性検定では、*NbVPg1*、*NbVPg2*、*NbVPg6*、*NbVPg7*、*NbVPg8*、*NbVPg9*、*NbVPg10* 及び *NbVPg19* の 8 系統中に抵抗性を示す個体が認められた (第 12 表)。また、*NbVPg3*、*NbVPg4*、*NbVPg5* 及び *NbVPg10* の 4 系統中にリカバリーを示す個体が確認された。これらのうち 50% 以上の個体がリカバリーを除く強い抵抗性を示したのは *NbVPg6*、*NbVPg7* 及び *NbVPg9* の 3 系統であった。

第 11 表 TuMV-NIb3'遺伝子を導入した *Nicotiana benthamiana* 形質転換体
T₁ 及び T₂ 世代の TuMV に対する反応

親系統	次世代のTuMVに対する反応			抵抗性 ^{a)} (%)
	抵抗性	回復型抵抗性	感受性	
T ₀ 植物				
<i>Nb</i> NIb3'1	6		14	30
<i>Nb</i> NIb3'2	0		20	0
<i>Nb</i> NIb3'3	13	5	2	65
<i>Nb</i> NIb3'4	0		20	0
<i>Nb</i> NIb3'5	8		12	40
<i>Nb</i> NIb3'6	0		20	0
<i>Nb</i> NIb3'7	18		2	90
<i>Nb</i> NIb3'8	12		8	60
<i>Nb</i> NIb3'9	2		18	10
<i>Nb</i> NIb3'10	5	5	10	25
<i>Nb</i> NIb3'11	0		20	0
<i>Nb</i> NIb3'12	10		10	50
<i>Nb</i> NIb3'13	0		20	0
<i>Nb</i> NIb3'14	14		6	70
<i>Nb</i> NIb3'15	14		6	70
<i>Nb</i> NIb3'16	0		20	0
<i>Nb</i> NIb3'17	0		20	0
<i>Nb</i> NIb3'18	0		20	0
<i>Nb</i> NIb3'19	0		20	0
<i>Nb</i> NIb3'20	0		20	0
T ₁ 植物				
<i>Nb</i> NIb3'3-R1	10		0	100
3-R2	10		0	100
3-R3	10		0	100
<i>Nb</i> NIb3'7-R1	10		0	100
7-R2	10		0	100
7-R3	10		0	100

a) 抵抗性(%)は回復型抵抗性を除く抵抗性個体の割合を示す。

第 12 表 TuMV-VPg 遺伝子を導入した *Nicotiana benthamiana*
 形質転換体 T₁ 世代の TuMV に対する反応

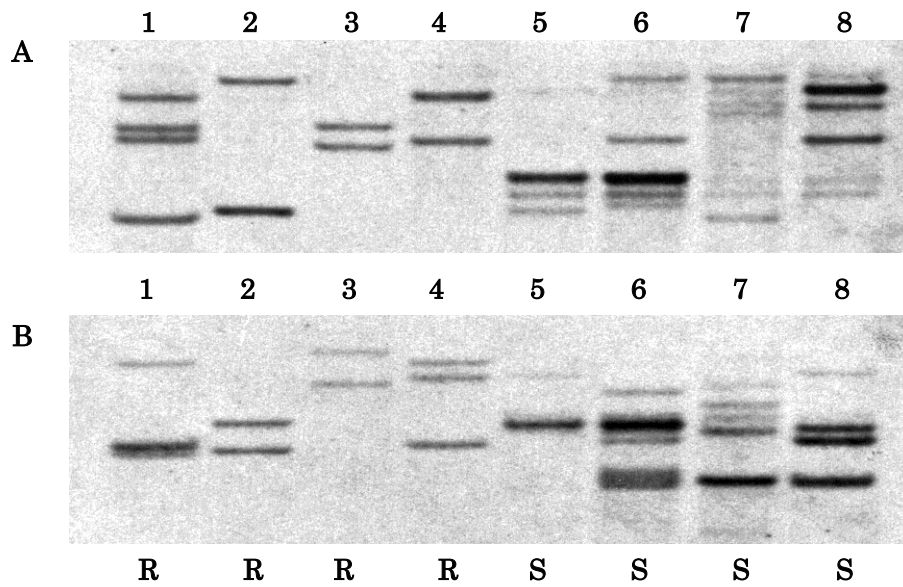
親系統	次世代のTuMVに対する反応			抵抗性 ^{a)} (%)
	抵抗性	回復型抵抗性	感受性	
To植物				
<i>Nb</i> VPg1	1		9	10
<i>Nb</i> VPg2	2		8	20
<i>Nb</i> VPg3		5	5	0
<i>Nb</i> VPg4		1	9	0
<i>Nb</i> VPg5		6	4	0
<i>Nb</i> VPg6	6		4	60
<i>Nb</i> VPg7	6		4	60
<i>Nb</i> VPg8	2		8	20
<i>Nb</i> VPg9	5		5	50
<i>Nb</i> VPg10	1	9	0	10
<i>Nb</i> VPg11	0		10	0
<i>Nb</i> VPg12	0		10	0
<i>Nb</i> VPg13	0		10	0
<i>Nb</i> VPg14	0		10	0
<i>Nb</i> VPg15	0		10	0
<i>Nb</i> VPg16	0		10	0
<i>Nb</i> VPg17	0		10	0
<i>Nb</i> VPg18	0		10	0
<i>Nb</i> VPg19	1		9	10
<i>Nb</i> VPg20	0		10	0
非形質転換体	0		10	100

a) 抵抗性(%)は回復型抵抗性を除く抵抗性個体の割合を示す。

(5) サザンブロット解析

第 6 表に示した *AtCP* の TuMV 抵抗性系統 (*AtCP42-R1*, *AtCP112-R1*, *AtCP202-R1*, *AtCP232-R1*) 及び感受性系統 (*AtCP22-S1*, *AtCP52-S1*, *AtCP82-S1*, *AtCP162-S1*) の各個体について、TuMV-CP 遺伝子をプローブにしたサザンブロット解析を行ない、導入遺伝子数 (コピー数) を解析した (第 13 図)。ゲノム DNA の消化に用いた制限酵素には、ベクター (pBI-TuCP) 内部に一箇所の切断部位を持つが CP 遺伝子を切断しない *Bam*HI 及びベクター内に切断部位を持たない *Eco*RV を用いた。その結果、*AtCP42-R1* の TuMV 抵抗性個体では *Bam*HI 処理により 4 本、*Eco*RV 処理により 3 本のバンドが検出されることから 4 コピーの CP 遺伝子が挿入されていることが推察された。また、*AtCP112-R1* 及び *AtCP202-R1* では同様に 2 コピー、*AtCP232-R1* では 3 コピーと推察された。感受性系統の *AtCP22-S1* では少なくとも 4 コピー、*AtCP52-S1*、*AtCP82-S1* 及び *AtCP162-S1* はいずれも 6 から 7 コピー以上の CP 遺伝子が挿入されていると考えられた。

NbCP のうち抵抗性及び感受性を示す各系統のコピー数を解析したところ、 T_1 世代で抵抗性系統と判断した 7 系統 (*NbCP1*, *NbCP2*, *NbCP9*, *NbCP12*, *NbCP13*, *NbCP19*, *NbCP20*) のうち *NbCP19* を除く 6 系統で 2 本以上のバンドが認められ、複数コピーであることが確認された (第 14 図)。これに対し、感受性系統では 7 系統中 6 系統 (*NbCP10*, *NbCP11*, *NbCP14*, *NbCP15*, *NbCP16*, *NbCP17*) で単一バンドが、また、15%の個体がリカバリーを示した *NbCP18* では 2 本のバンドが検出された。



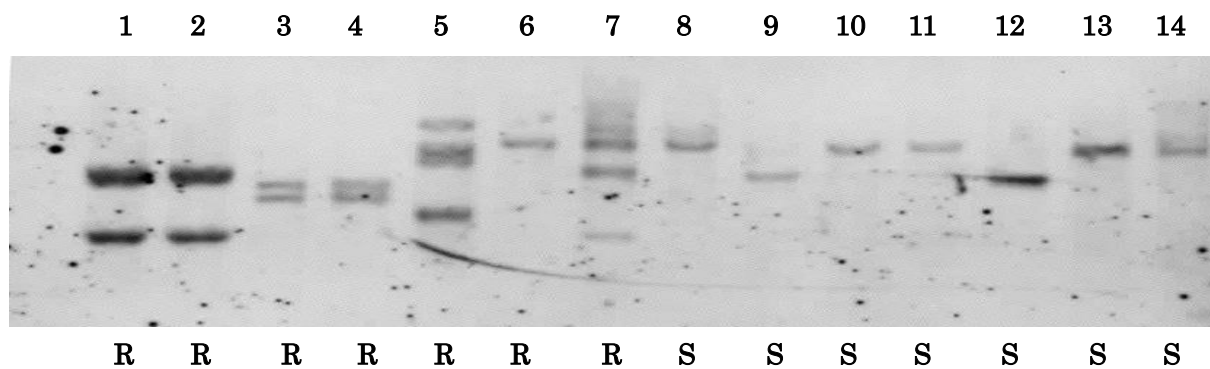
第 13 図 TuMV-CP 遺伝子を導入したシロイヌナズナ形質転換体のサザンブロット解析.

A: *Bam*HI 処理したゲノム DNA、B: *Eco*RV 処理したゲノム DNA.

1, *At*CP42-R1; 2, *At*CP112-R1; 3, *At*CP202-R1; 4, *At*CP232-R1;

5, *At*CP22-S1; 6, *At*CP52-S1; 7, *At*CP82-S1; 8, *At*CP162-S1.

表現型 R: 抵抗性 S:感受性



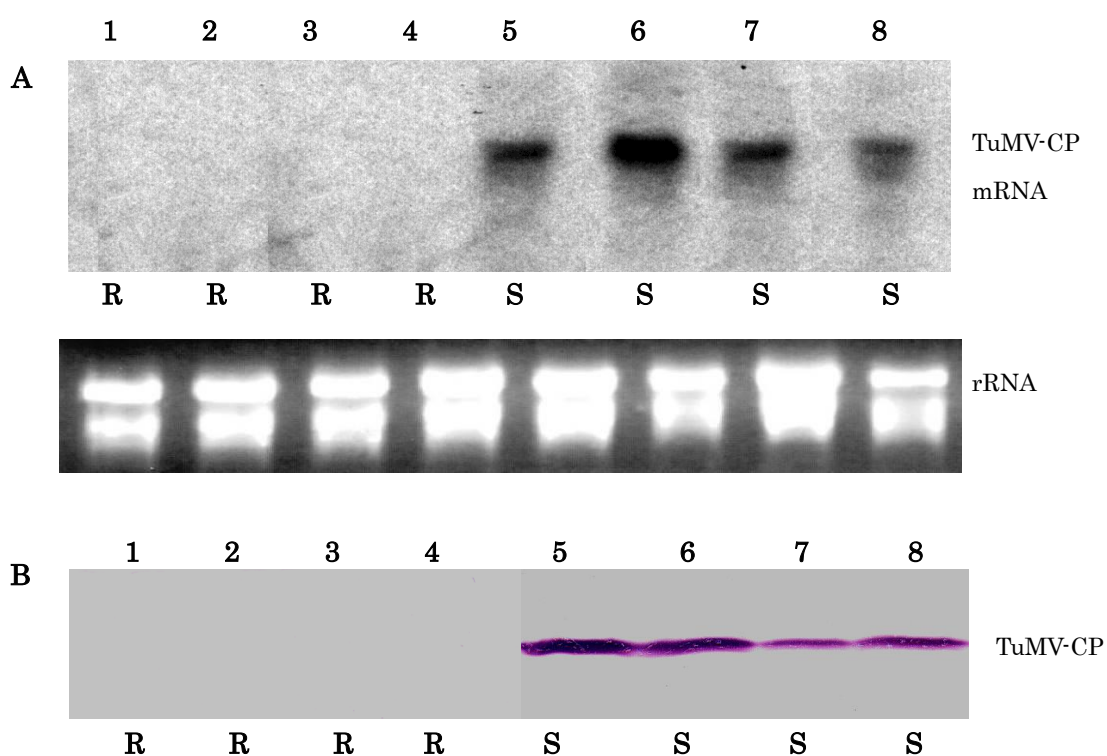
第 14 図 TuMV-CP 遺伝子を導入した *Nicotiana benthamiana* 形質転換体 T₁ 世代のサザン
 ブロット解析.

1, *NbCP1*; 2, *NbCP2*; 3, *NbCP9*; 4, *NbCP12*; 5, *NbCP13*; 6, *NbCP19*;
 7, *NbCP20*; 8, *NbCP10*; 9, *NbCP11*; 10, *NbCP14*; 11, *NbCP15*; 12, *NbCP16*;
 13, *NbCP17*; 14, *NbCP18*.

表現型 R : 抵抗性 S : 感受性

(6) 導入遺伝子の発現解析

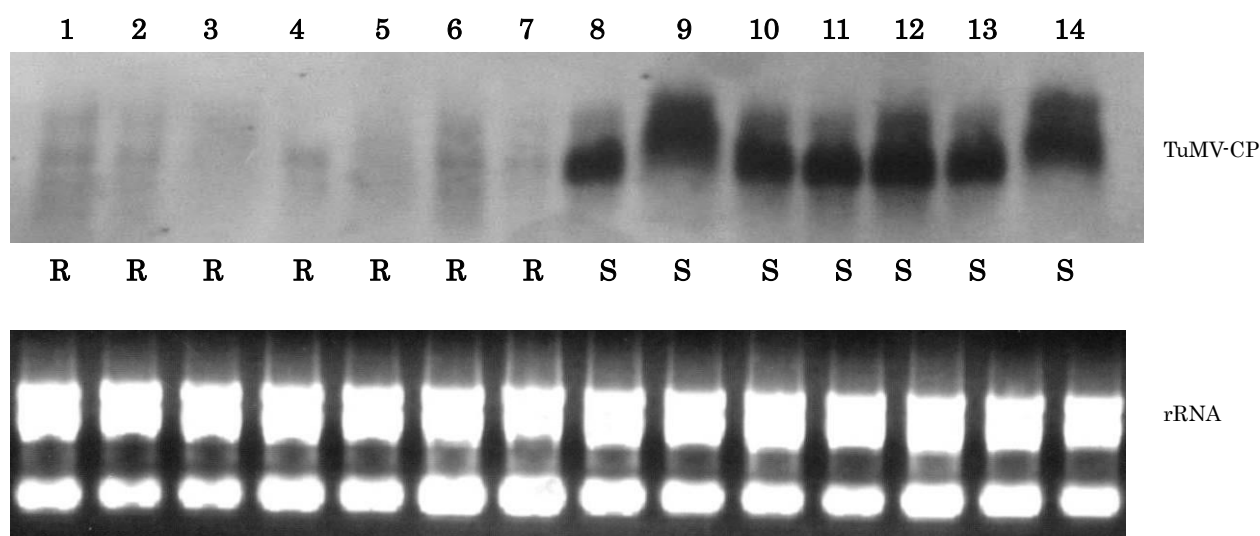
T₃世代の表現型を決定後、抵抗性及び感受性植物における CP 発現の関与を調べた。まず、*AtCP* の TuMV 抵抗性系統 (*AtCP42-R1*, *AtCP112-R1*, *AtCP202-R1*, *AtCP232-R1*) 及び感受性系統 (*AtCP22-S1*, *AtCP52-S1*, *AtCP82-S1*, *AtCP162-S1*) について、TuMV 接種前の各個体から葉のサンプルを採取して全 RNA を抽出し、TuMV-CP 遺伝子をプローブにしてノーザンブロット解析を行った。次にサンプルを採取した植物体に TuMV を接種して供試した個体が抵抗性及び感受性の表現型を示すことを確認した。その結果、抵抗性系統ではいずれも mRNA が検出されなかったのに対し、感受性系統では、全ての供試個体から mRNA が検出された (第 15 図 A)。また、CP のウエスタンブロット解析でも mRNA と同様に抵抗性系統では CP は検出されないが、感受性系統からは CP の明確なシグナルが検出された (第 15 図 B)。



第 15 図 TuMV-CP 遺伝子を導入したシロイヌナズナ形質転換体のノーザンブロット(A)及びウエスタンブロット(B)解析。

1, *AtCP42-R1*; 2, *AtCP112-R1*; 3, *AtCP202-R1*; 4, *CP232-R1*;
5, *AtCP22-S1*; 6, *AtCP52-S1*; 7, *AtCP82-S1*; 8, *AtCP162-S1*.
表現型 R: 抵抗性 S: 感受性

NbCP の TuMV 抵抗性系統及び感受性系統からも全 RNA を抽出後、ノーザンブロット解析を行った。なお、T₁ 世代の表現型は RNA 抽出用のサンプル葉を採取後にウイルスを接種して確認した。その結果、抵抗性系統である *NbCP1*、*NbCP2*、*NbCP9*、*NbCP12*、*NbCP13*、*NbCP19* 及び *NbCP20* の抵抗性個体では全ての供試個体で mRNA が検出されないか、またはわずかに反応が認められる程度であったのに対し、感受性系統 (*NbCP10*、*NbCP11*、*NbCP14*、*NbCP15*、*NbCP16*、*NbCP17*、*NbCP18*) では全ての個体から CP の mRNA が検出された (第 16 図)。

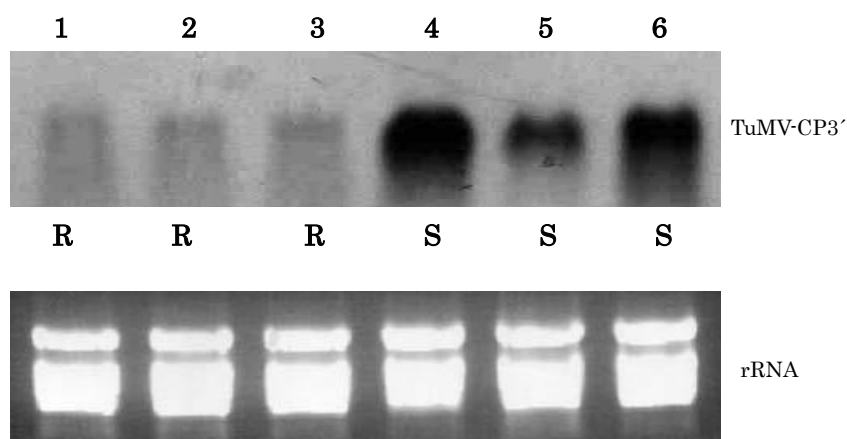


第 16 図 TuMV-CP 遺伝子を導入した *Nicotiana benthamiana* 形質転換体 T₁ 世代のノーザンブロット解析。

1, *NbCP1*; 2, *NbCP2*; 3, *NbCP9*; 4, *NbCP12*; 5, *NbCP13*; 6, *NbCP19*;
7, *NbCP20*; 8, *NbCP10*; 9, *NbCP11*; 10, *NbCP14*; 11, *NbCP15*; 12, *NbCP16*;
13, *NbCP17*; 14, *NbCP18*.

表現型 R : 抵抗性 S : 感受性

*NbCP3'*では *NbCP3'3-R1*、*NbCP3'3-R2*、及び *NbCP3'3-R3* を抵抗性系統として選抜し、 T_1 世代のすべてが感受性であった *NbCP3'2*、*NbCP3'7* 及び *NbCP3'8* の T_1 世代と比較した。抵抗性及び感受性の表現型は RNA 抽出用のサンプル葉を採取後にウイルスを接種して確認した。その結果、全長の CP 遺伝子を導入した場合と同様に感受性系統の供試個体からはいずれも導入遺伝子が明確なシグナルとして検出されるが、抵抗性系統の供試個体からはわずかに反応が認められる程度であった (第 17 図)。

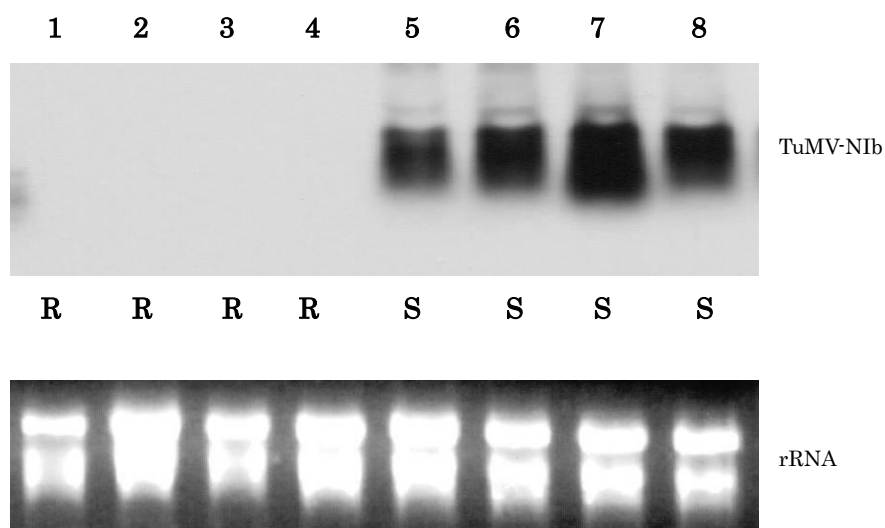


第 17 図 TuMV-CP3'遺伝子を導入した *Nicotiana benthamiana* T_1 世代及び T_2 世代のノーザンブロット解析.

1, *NbCP3'3-R1*; 2, *NbCP3'3-R2*; 3, *NbCP3'3-R3*; 4, *NbCP3'2*;
5, *NbCP3'7*; 6, *NbCP3'8*.

表現型 R : 抵抗性 S : 感受性

*NbNIb3'*の T₁ 世代では、抵抗性系統である *NbNIb3'3*、*NbNIb3'7*、*NbNIb3'8* 及び *NbNIb3'10* の抵抗性個体では導入遺伝子が検出されないのに対し、感受性系統である *NbNIb3'2*、*NbNIb3'4*、*NbNIb3'6*、及び *NbNIb3'11* で導入遺伝子の明確なシグナルが検出された (第 18 図)。なお、抵抗性及び感受性の表現型は RNA 抽出用のサンプル葉を採取後にウイルスを接種して確認した。

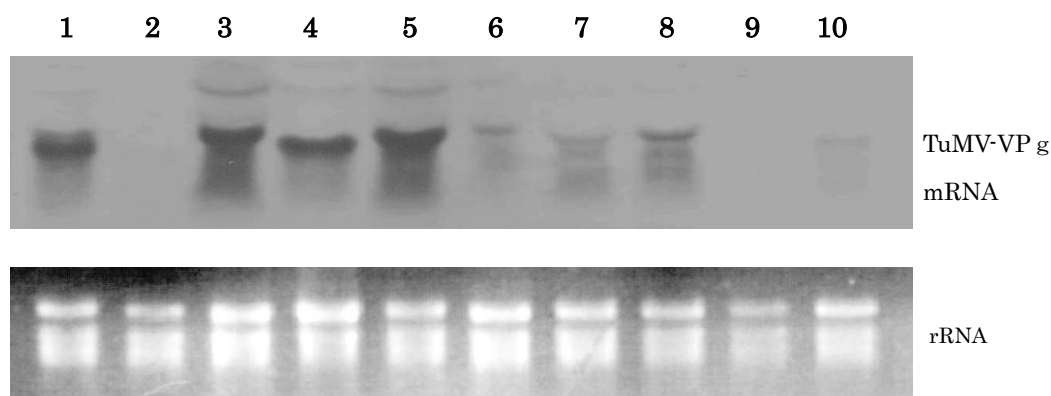


第 18 図 TuMV-NIb3' 遺伝子を導入した *Nicotiana benthamiana* 形質転換体 T₁ 世代のノーザンブロット解析.

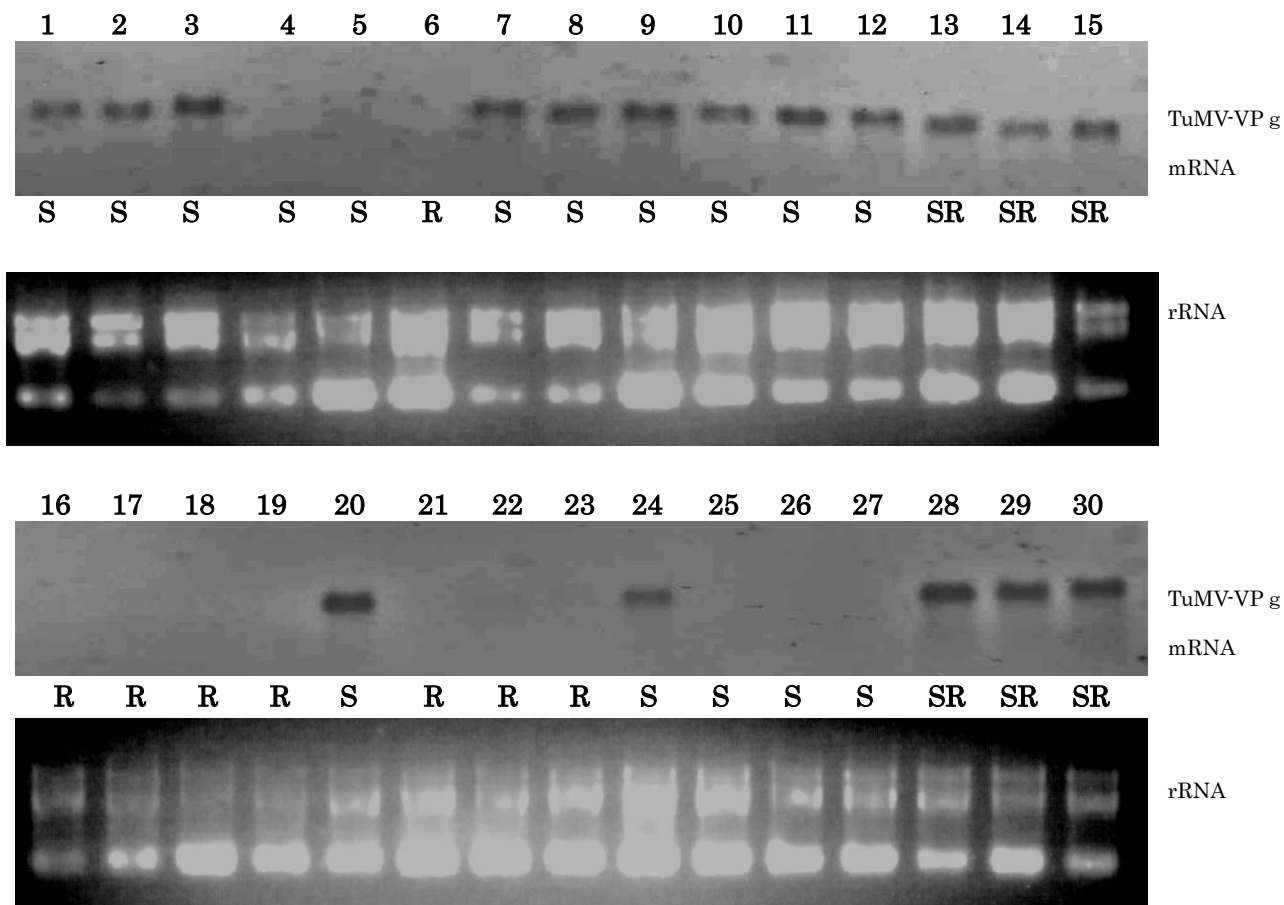
1, *NbNIb3'3*; 2, *NbNIb3'7*; 3, *NbNIb3'8*; 4, *NbNIb3'10*;
5, *NbNIb3'2*; 6, *NbNIb3'4*; 7, *NbNIb3'6*; 8, *NbNIb3'11*.

表現型 R : 抵抗性 S : 感受性

*NbVPg*については*NbVPg1*~*NbVPg10*のT₀世代及びT₁世代のノーザンブロット解析を行った。T₀世代では*NbVPg1*、*NbVPg3*、*NbVPg4*、*NbVPg5*のmRNA検出レベルが高く、これらはT₁世代で感受性またはリカバリーと感受性が分離する系統であった。*NbVPg6*、*NbVPg7*、*NbVPg8*及び*NbVPg10*についてはわずかにシグナルが検出される程度であり、*NbVPg2*、*NbVPg9*については検出されなかった(第19図)。次に各T₀世代由来のT₁世代から個体別にRNAを抽出し、ノーザンブロットを行った後、TuMVを接種して表現型を確認した。その結果、供試した全ての個体でmRNAが検出されたのは、*NbVPg1*(第20図:lanes 1~3)、*NbVPg3*(第20図:lanes 7~9)、*NbVPg4*(第20図:lanes 10~12)、*NbVPg5*(第20図:lanes 13~15)及び*NbVPg10*(第20図:lanes 28~30)であり、これらの個体はほとんどが感受性またはリカバリー(*NbVPg5*)であった。*NbVPg2*(第20図:lanes 4~6)では抵抗性と感受性が分離したが、いずれの個体もmRNAは検出されなかった。*NbVPg6*はmRNAが検出されず、供試個体はいずれも抵抗性であり、*NbVPg7*(第20図:lanes 19~21)及び*NbVPg8*(第20図:lanes 22~24)はmRNAが検出された個体は感受性で検出されなかった個体は抵抗性であった。さらに、抵抗性と感受性が分離する*NbVPg9*(第20図:lanes 25~27)の供試個体ではいずれもmRNAは検出されなかったが、表現型は感受性であった。



第19図 TuMV-VPg 遺伝子を導入した *Nicotiana benthamiana* T₀ 世代のノーザンブロット解析.
 1, *NbVPg1*; 2, *NbVPg2*; 3, *NbVPg3*; 4, *NbVPg4*; 5, *NbVPg5*;
 6, *NbVPg6*; 7, *NbVPg7*; 8, *NbVPg8*; 9, *NbVPg9*; 10, *NbVPg10*.

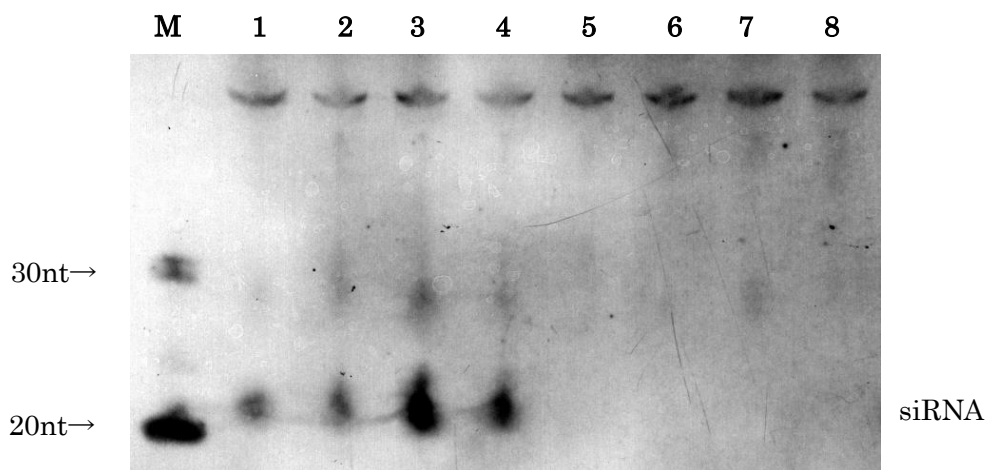


第 20 図 TuMV-VPg 遺伝子を導入した *Nicotiana benthamiana* T₁ 世代のノーザンブロット解析.

1, *NbVPg1-1*; 2, *NbVPg1-2*; 3, *NbVPg1-3*; 4, *NbVPg2-1*; 5, *NbVPg2-2*; 6, *NbVPg2-3*;
 7, *NbVPg3-1*; 8, *NbVPg3-2*; 9, *NbVPg3-3*; 10, *NbVPg4-1*; 11, *NbVPg4-2*; 12, *NbVPg4-3*;
 13, *NbVPg5-1*; 14, *NbVPg5-2*; 15, *NbVPg5-3*; 16, *NbVPg6-1*; 17, *NbVPg6-2*; 18, *NbVPg6-3*;
 19, *NbVPg7-1*; 20, *NbVPg7-2*; 21, *NbVPg7-3*; 22, *NbVPg8-1*; 23, *NbVPg8-2*; 24, *NbVPg8-3*;
 25, *NbVPg9-1*; 26, *NbVPg9-2*; 27, *NbVPg9-3*; 28, *NbVPg10-1*; 29, *NbVPg10-2*; 30, *NbVPg10-3*.
 表現型 R: 抵抗性 SR:回復型抵抗性 S:感受性

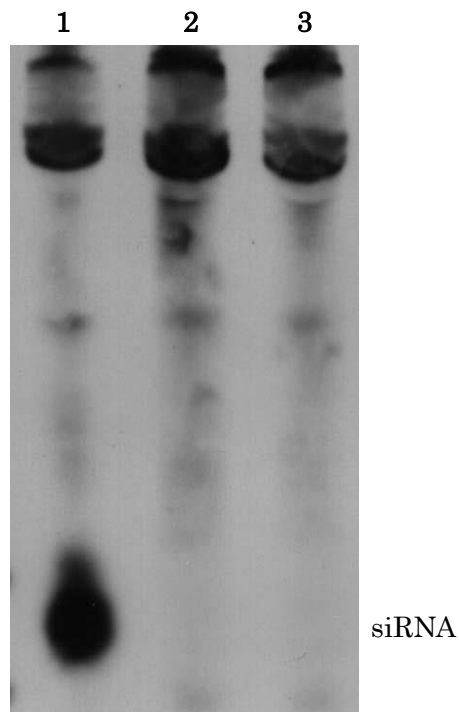
(7) siRNA の検出

AtCP から siRNA の検出を試みた。その結果、TuMV 抵抗性系統 (*AtCP42-R1*, *AtCP112-R1*, *AtCP202-R1*, *AtCP232-R1*) の植物からは TuMV-CP 遺伝子に特異的なシグナルが 20~25 nt の位置に検出されたが、感受性系統 (*AtCP22-S1*, *AtCP52-S1*, *AtCP82-S1*, *AtCP162-S1*) の植物からは検出されなかった (第 21 図)。さらに、CP 遺伝子内でも TuMV 分離株間で保存性の高い 3'末端側 380 nt の領域に対するプローブを作製し、同様の解析を行ったところ、抵抗性系統の植物では明確なシグナルが検出されたのに対し、感受性系統では検出されなかった (第 22 図)。



第 21 図 TuMV-CP 遺伝子を導入したシロイヌナズナの TuMV 抵抗性形質転換体に特異的に検出される siRNA.

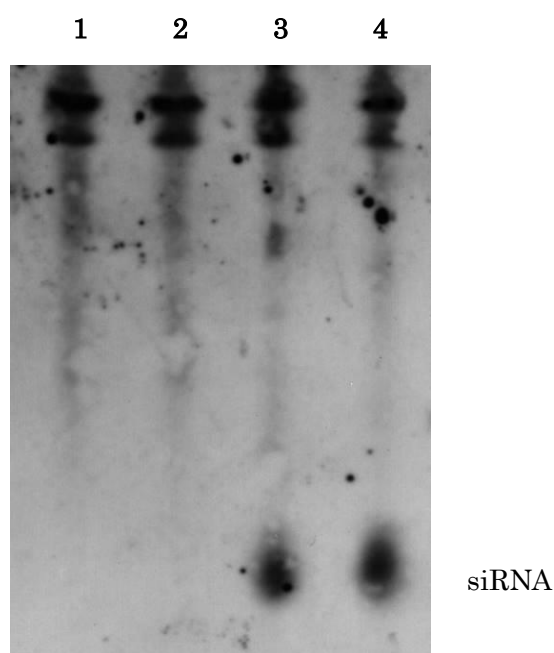
1, *AtCP42-R1*; 2, *AtCP112-R1*; 3, *AtCP202-R1*; 4, *AtCP232-R1*;
5, *AtCP22-S1*; 6, *AtCP52-S1*; 7, *AtCP82-S1*; 8, *AtCP162-S1*.
M. サイズマーカー



第 22 図 TuMV-CP 遺伝子を導入したシロイヌナズナからの 3'末端側 380nt 保存領域プローブによる siRNA の検出.

- 1, TuMV 抵抗性形質転換体 (*AtCP112-R1*);
- 2, 感受性形質転換体 (*AtCP52-S1*);
- 3, 非形質転換体 (*Col-0*).

AtCP と同様に、*NbCP* から *siRNA* の検出を試みた。その結果、抵抗性系統 *NbCP12-R1* の T_1 植物では *TuMV* 接種前に収集した葉から *siRNA* が検出されたのに対し、リカバリーを示す系統 *NbCP4* の T_1 植物では *TuMV* 接種前には *siRNA* は検出されず、接種後に病徴を示した後に展開してきた無病徴の葉からは *siRNA* が検出された。感受性系統 (*NbCP10-S1*) の植物からは *siRNA* は検出されなかった (第 23 図)。



第 23 図 *TuMV-CP* 遺伝子を導入した *Nicotiana benthamiana* の *TuMV* 抵抗性形質転換体に特異的に検出される *siRNA*.

1, 感受性形質転換体(*NbCP10-S1*); 2, 回復型抵抗性形質転換体(*NbCP4:TuMV* 接種前); 3, 回復型抵抗性形質転換体 (*NbCP4:TuMV* 接種後); 4, 抵抗性形質転換体 (*NbCP12-R1:TuMV* 接種前).

4. 考察

本章では TuMV の CP 遺伝子をシロイヌナズナに導入した形質転換体 (*At* CP) 23 系統を作出し、その特性を調べた。また、TuMV の CP 遺伝子を *N. benthamiana* に導入した形質転換体 (*Nb*CP) の他、CP3'、Nib3' 及び VPg 遺伝子を *N. benthamiana* に導入した形質転換体を作成して特性を調べた。*At* CP の TuMV に対する反応を調べた結果、8 系統の T₂ 植物の中に TuMV 抵抗性を示す個体が認められた。また、*Nb*CP の TuMV に対する反応では 7 系統の T₁ 世代植物で過半数の供試個体が高度な抵抗性を示した。シロイヌナズナや *N. benthamiana* は TuMV に対する感受性が高く、感染すると株全体が萎縮するなど激しい病徴を示すが、CP 遺伝子を導入した形質転換体からは高度な抵抗性を示し、TuMV が感染しない個体が選抜された。また、抵抗性個体の後代は形質が分離するか、または全ての個体が抵抗性を示し、さらに後代について選抜を繰り返すことにより安定して TuMV 抵抗性を示す系統が得られた。このことから、TuMV-CP 遺伝子を導入した形質転換体の中から自殖・選抜を繰り返すことで、より安定した抵抗性系統が得られることが示された。*N. benthamiana* では TuMV-CP の他、CP3' 及び Nib3' を導入した植物でも 2 回以上の自殖と選抜により全ての個体が抵抗性となる系統が得られ、その後代では TuMV 抵抗性が維持されていた。したがって、各種作物にウイルス遺伝子を導入後、ウイルス抵抗性を示す系統を効率的に獲得するためには、自殖できる作物ではその後代から抵抗性個体を選抜することで、安定したウイルス抵抗性系統がより効率的に得られるものと考えられる。

TMV の CP 遺伝子を導入したタバコの TMV 抵抗性には CP の発現が必要と考えられている (Powell et al., 1990)。一方、TEV や PVY の CP 遺伝子を導入した植物で見られる RNA レベルでの抵抗性を示す植物の場合、導入遺伝子由来する mRNA の蓄積量は低いが、核における転写活性は高いことなどがその特長として挙げられる (Lindbo and Dougherty, 1992; Dougherty et al., 1994)。このような抵抗性は動植物に備わる RNA の特異的分解機構である RNA サイレンシングによるものであり、その機構が解明されてきた (Ding, 2000; Voinnet, 2001; Baulcombe, 2004; Lindbo and Dougherty, 2005)。Waterhouse ら (1998) はウイルスゲノムに対してセンス側とアンチセンス側の相同配列を同時にもつ植物は、片方しかもたない植物よりもウイルス抵抗性が高率で獲得できることを報告し、RNA サイレンシングにおける dsRNA の関与を示した。また、RNA サイレンシングが起こっている植物からは dsRNA の分解により生じた 21-24 nt の siRNA が検出され、RNA サイレンシングの指標となることが示されている (Hamilton and Baulcombe, 1999)。本実験で供試した *At*CP の場合、抵抗性系統ではウエスタンブロット法により CP が検出されなかったのに対し、CP が検出された系統は全て TuMV 感受性であった。このことから、TuMV-CP 遺伝子を導入した植物の抵抗性はタンパク質を介したものではないと考えられる。また、導入遺伝子の mRNA を見ると、感受性系統ではいずれも CP 遺伝子が検出されたが、抵抗性系統ではいずれの植物からも検出されなかった。抵抗性系統からは導入遺伝子のプローブと反応する siRNA のシグナルが検出された。これらの結果は、*At*CP の TuMV 抵抗性植物における抵抗性メカニズムは、RNA サイレンシングによるものであることを示している。

同様に、*N. benthamiana* に導入した遺伝子は、全長の CP 遺伝子以外はいずれもタンパク質への翻

訳が出来ない遺伝子である。導入遺伝子由来の mRNA 発現レベルを見ると、抵抗性系統ではいずれも検出レベルが低いか、または検出されなかった。*NbVPg* では感受性系統と同程度の mRNA が検出される個体が存在したが、これらはいずれもリカバリーを示す個体であった。CP 遺伝子を導入した TuMV 抵抗性植物からは導入遺伝子由来の siRNA が検出された。これらの結果は、本実験で用いた CP や Nib、VPg などのウイルス遺伝子を導入して抵抗性植物を作出する際に導入遺伝子由来のタンパク質は必要なく、TuMV 遺伝子を導入し、RNA サイレンシングを起こしている個体・系統を選抜することにより TuMV 抵抗性植物を作出することが可能であることを示している。

CP 遺伝子以外の遺伝子を導入した形質転換植物におけるウイルス抵抗性については、Potyvirus では Nib 遺伝子や VPg 遺伝子、P1 遺伝子、HC-Pro 遺伝子などについて研究が行われた事例がある (Audy et al., 1994; Jones et al., 1998; Moreno et al., 1998; Maki-Valkama et al., 2000; Germundsson et al., 2006)。本研究では TuMV の CP3'、Nib3' 及び VPg 遺伝子を導入した場合にも、CP 遺伝子を導入した場合と同様にリカバリーではない強い抵抗性を示す系統が得られた。自殖後代の 50%以上が強い抵抗性を示した系統数は、*NbCP3'* では作出した 20 系統中 1 系統 (5%)、*NbNib* では同様に 6 系統 (30%)、*NbVPg* では 3 系統 (15%) であった。これらの結果から、CP、Nib または VPg を用いて遺伝子組換えにより TuMV 抵抗性植物を育成しようとする場合、基本的には導入遺伝子の種類には依存しないと考えられる。

導入遺伝子の長さで抵抗性個体の獲得効率について、Pang ら (1997) はトマト黄化えそウイルス (tomato spotted wilt virus, TSWV) の長さの異なる N 遺伝子断片を *N. benthamiana* に導入した形質転換体を作成し、導入遺伝子長が 387~453 nt では TSWV 抵抗性系統が得られるが、92~235 nt では抵抗性系統が得られないこと、また、236~387 nt の遺伝子断片を GFP 遺伝子と融合させて導入すれば抵抗性系統が得られることから、ウイルス抵抗性植物を得るには導入遺伝子について一定の長さが必要であることを示した。本研究で用いた TuMV-CP 遺伝子の場合、T₂ 世代の過半数が完全な抵抗性となる系統の獲得効率は全長 CP 遺伝子 (864 nt) を導入した場合は 35% であり、その半分の長さに相当する CP3' 遺伝子 (430 nt) は 5% と効率が低かった。このことから単一の遺伝子を導入してウイルス抵抗性植物を獲得するためには少なくとも全長 CP 遺伝子 (864 nt) 程度の長さを持つ遺伝子を導入後、選抜する方が効率的であると推察される。

サザンブロット解析の結果、*AtCP* の抵抗性系統では 2~4 コピー、感受性系統では 2~7 コピー以上と推察された。*AtCP* の後代から得られた全個体が抵抗性となる 3 つの系統 (*AtCP112-R1*, *AtCP202-R1*, *AtCP232-R1*) のコピー数は 2~3 であった。これらの後代も抵抗性であり、形質は固定されていた。一方、4 コピーと推定された *AtCP4* の後代ではいずれも抵抗性と感受性の形質が分離した。TSWV の N 遺伝子を導入したレタスでは、導入遺伝子をホモで持つ個体の方がヘテロの個体よりも高度な抵抗性を示し、導入遺伝子のホモ化が抵抗性を誘導するのに重要であることが報告されている (Pang et al. 1996)。また、TEV の CP を導入したタバコでは、導入遺伝子数が 1~3 のタバコについて、各遺伝子がホモまたはヘテロの系統を育成し、3 コピー以上の導入遺伝子を持つ個体が高度な抵抗性を示すことが報告されている (Goodwin et al., 1996)。本実験では導入遺伝子についてホモまたはヘテロの解析は行わなかったものの、*AtCP112-R1*、*AtCP202-R1* 及び *AtCP232-R1*

の3系統ではTuMV抵抗性の形質に分離が認められないことなどから、自殖によって導入遺伝子がホモ化していることが考えられる。また、AtCPではAtCP8やAtCP16などの高コピー数のものに感受性系統が存在することから、導入遺伝子のコピー数とウイルス抵抗性の間に必ずしも相関があるわけではないことが示された。一方、NbCPのサザンブロット解析では抵抗性系統は2~4コピー、感受性系統の多くは1コピーであり、1コピーの植物からは抵抗性系統は得られにくいと考えられた。

アグロバクテリウム法によって形質転換した植物における導入遺伝子の状態は、一般にそのコピー数だけでなく、DNAのメチル化などが起こる場合があり(Bender, 2001)、ゲノム上の挿入部位も不特定であることなどから導入遺伝子の発現レベルは形質転換体ごとに異なる。自殖後代ではこのような導入遺伝子の状態が固定または分離していく。さらに、逆方向反復配列(inverted repeat)(Que et al., 1997)の状態などによりRNAサイレンシングを誘導するdsRNAの形成効率が異なってくる。AtCPのT₂世代及び*N. benthamiana*形質転換体のT₁世代では全個体が抵抗性になる系統は認められなかったが、これらの自殖後代からは全ての個体がTuMV抵抗性を示す系統を選抜することが可能であった。この結果は自殖による導入遺伝子のホモ化やコピー数の増加がRNAサイレンシングを誘導するdsRNAの形成効率を向上させたことによることが推察される。これに対し、AtCP4では4コピーと推定されることからT₂系統では自殖後の導入遺伝子が分離し、個体ごとに各導入遺伝子についてホモまたはヘテロなどの状態が異なることがdsRNAの形成効率に影響し、安定した抵抗性の形質を示す系統が得られていないことが推察される。同様に、AtCP8やAtCP16などでは高コピーであってもRNAサイレンシングを誘導するdsRNAが形成されず、導入遺伝子由来のCPが正常に発現していると考えられる。

本研究で作出した*N. benthamiana*形質転換体の中には、接種後に展開した葉には病徴が見られるが、その後の生育に伴い病徴が消失するリカバリーを示す個体が認められ、病徴が回復した葉からは導入遺伝子由来のsiRNAが検出されることから、TuMVの感染によりRNAサイレンシングが誘導されていることが確認された。一方、VPgを導入した*N. benthamiana*ではmRNAが検出されないがTuMV抵抗性と感受性個体が2:8に分離するT₁系統(NbVPg2)と、同数に分離するT₁系統(NbVPg9)が認められた。これらの系統については導入したVPg遺伝子のコピー数や、導入したVPg遺伝子に由来するsiRNA生成の確認は行っていない。しかし複数コピーで異なる染色体上に導入されたVPg遺伝子がT₂世代で分離し、RNAサイレンシングが誘導されてTuMV抵抗性を示す個体と、mRNAの転写抑制(transcriptional gene silencing)(Vaucheret and Fagard, 2001)など何らかの要因でmRNAが発現せずにTuMV感受性を示す個体が分離していることが推察される。

RNAサイレンシングは塩基配列特異的なRNAの分解機構である。ウイルス遺伝子を導入した形質転換植物におけるウイルス抵抗性は、導入遺伝子とターゲット遺伝子との相同性に依存することから相同性依存型抵抗性と呼ばれており、このような抵抗性はウイルスの系統に対して特異的に効果を示す場合がある。PRSVのCP遺伝子を導入したPRSV抵抗性パパイヤは最も早く実用化されたウイルス抵抗性組換え作物の一つだが、ハワイで発生するPRSV系統のみに抵抗性を示し、CPの相同性が96%と近縁なPRSVには感受性であった(Tennant et al., 1994)。また、PVYのP1遺伝子を導入したジャガイモでは導入遺伝子とウイルス遺伝子の相同性が96%程度であっても抵抗性が打破さ

れることが報告されている (Maki-Valkama et al., 2000)が、PRSV の CP を導入したパパイヤから 4 種類の PRSV 系統に抵抗性のパパイヤが得られている (Bau et al., 2003)。一方、本研究で導入遺伝子に用いた TuMV-JO と汁液接種試験に供試した CP 遺伝子の相同性は、86.6% (IS1) から 97% (2J) であり、17 株中 9 株が 90%未満である。また、分離した地域は日本の他、イタリア、ブラジル、中国等が含まれ、分離した宿主はナタネ、ダイコン等である。また、分子系統学的に分類された 4 つのグループに属する全ての TuMV を含んでいる (Tomimura et al., 2003)。そのため、本実験で供試した TuMV は塩基配列及び病原性の点で多様な系統を網羅していると考えられる。本研究で作出した抵抗性 *AtCP* はいずれも供試した全ての TuMV 分離株に対して抵抗性であったことから、TuMV では CP 遺伝子の相同性や病原性の違いに関わらず、現在までに発生が確認されている TuMV によって抵抗性が打破される可能性は低いことを示している。このように本研究で選抜した *AtCP* における TuMV 抵抗性は広範な TuMV に対して有効であり、系統特異的な抵抗性は認められなかった。TuMV-CP の 3'末端側は保存性が高いことが知られており (Ohshima et al., 2002)、本実験でも導入した CP と汁液接種に供試した TuMV 分離株における CP の 3'末端側領域は 95.5%以上の高い相同性を有している。本研究で作出した形質転換植物では導入した CP から生じた dsRNA から 21~24nt 程度の長さの siRNA が生成され、さらにこれと相補的な配列をもつ TuMV の RNA が検出されなかったことから、特異的にこの領域が siRNA を介して切断されていることが示唆された。特に、形質転換した CP の 3'末端領域配列には、供試した全ての TuMV 系統の配列と 21 塩基以上 100%一致する領域が複数存在することから、広域な TuMV に対する抵抗性が付加されたと推測された。

第4章 TuMV 抵抗性形質転換体の CMV 感染による抵抗性打破

複数の植物ウイルスが同一植物に混合感染すると、単独感染の場合よりも激しい病徴を示すことが知られている。例えば PVY などの Potyvirus と PVX がタバコなどに混合感染すると、PVX の増殖が上昇し、それぞれの単独感染に比べて病徴が激化する。このような現象は相乗作用と呼ばれる。相乗作用に関連するウイルス遺伝子が形質転換植物を用いて解明されてきた。Pruss ら (1997) は TEV の HC-Pro を発現する形質転換タバコに PVX を感染させると、TEV と PVX が混合感染した時のような激しい病徴と PVX の増殖促進が起こることを見出した。同様に、HC-Pro 形質転換タバコに CMV や TMV を感染させた場合にも、それぞれのウイルスが非形質転換植物に単独感染した場合と比較して病徴の激化が起こることから、HC-Pro が相乗作用に関与していることが証明された。その後、HC-Pro が RNA サイレncing を抑制するウイルス因子 (RNA silencing suppressor; RSS) であり、その機能によって PVX の増殖レベルが上昇すると考えられるようになった。

HC-Pro が RSS として機能することは形質転換植物やウイルスベクターを用いた解析により証明された。例えば、HC-Pro を発現する形質転換タバコと、RNA サイレncing によって GUS 遺伝子の発現が抑制されているタバコを交配したところ、その F1 では RNA サイレncing が解除されていた。変異型 HC-Pro や非形質転換体との交配では RNA サイレncing が解除されず、この結果により HC-Pro が RNA サイレncing を抑制する機能を持つことが示された (Anandalakshmi et al., 1998; Kasschau and Carrington, 1998)。一方、Brigneti ら (1998) は PVX ベクターを用い、HC-Pro が RSS であることを示した。すなわち、GFP 遺伝子を形質転換した *N. benthamiana* に GFP 遺伝子に対する全身サイレncing を誘導させ、その個体に PVY をチャレンジ接種させたところ、感染後に展開した葉で GFP 蛍光の回復が観察された。また、PVY のコードする様々な因子をそれぞれ組み込んだ PVX ベクターを接種して同様に観察を行ったところ、HC-Pro を発現する PVX ベクターを接種した個体で GFP 蛍光の回復が観察され、HC-Pro が RSS であることが明らかとなった。Brigneti らは、HC-Pro と同様の手法により CMV の 2b タンパク質 (2b) が RSS であることも証明している。その後、PVX の p25、tomato bushy stunt virus (TBSV) の p19、TMV の 130K タンパク質など、多くの植物ウイルスで RSS が同定され、RSS はウイルスが植物側の防御反応の 1 つである RNA サイレncing 機構から身を守るために必要な因子であると考えられるようになった (Carrington et al., 2001)。

第3章では TuMV-CP 遺伝子を導入した形質転換体から RNA サイレncing により広範な TuMV に対して抵抗性を示す系統を選抜できることを示した。しかし作出した形質転換体は TuMV 以外のウイルスに対しては感受性であると考えられ、多様なウイルスが発生する自然環境下で栽培した場合は RSS を持つウイルスの感染により TuMV 抵抗性が影響を受ける可能性が推察される。Mitter ら (2003) は PVY の NIa 遺伝子を導入した PVY 抵抗性のタバコに CMV の強毒系統が感染すると、PVY が感染出来るようになることを示した。また、PPV の NIb 遺伝子を含む 5' 末端領域を導入した *N. benthamiana* の PPV 抵抗性は、CMV 強毒系統の感染によって打破されるが、Potyvirus である TVMV の感染では打破されない (Simón-Mateo et al., 2003)。このように、RNA サイレncing によりウイルス抵抗性を示す植物に他のウイルスが感染した際に見られる抵抗性の打破は、多様なウイル

スが発生する自然環境下で RNA サイレンシングを誘導したウイルス抵抗性植物を栽培しようとした際に重要な課題と考えられる。しかし、病原性の弱い CMV 系統 (マイルド系統) が、CP などの遺伝子を導入した形質転換植物におけるウイルス抵抗性に与える影響についてはこれまでに明らかにされていない。そこで本章では、神奈川県のとまとから CMV のマイルド系統を分離してその特性を調べるとともに、第 3 章で TuMV-CP 遺伝子の導入により作出した TuMV 抵抗性のシロイヌナズナ形質転換体及び *N. benthamiana* 形質転換体を用い、マイルド系統の CMV が形質転換体における TuMV 抵抗性に与える影響について、CMV と同様に RSS の機能が解析されている主要ウイルスである PVY や PVX と比較しながら検討を行った。

第 1 節 神奈川県のとまとから分離した CMV の特性

1. 緒言

CMV はプロモウイルス科ククモウイルス属 (*Cucumovirus*) のタイプ種であり、粒子は直径約 30 nm の球状で、自然界では主にアブラムシによって伝播される。CMV は多犯性のウイルスで、双子葉草本植物を中心に、宿主植物は単子葉から木本植物まで 1,000 種に達すると推定されている (Palukaitis et al., 1992)。CMV はこのように広い宿主範囲をもつことから温帯地方を中心に亜熱帯、熱帯地域など極めて広範囲で被害を及ぼしており、日本だけでなく、世界的な重要病原ウイルスの一つである。

CMV の核酸は一本鎖 RNA であり、分子量の異なる 3 つの RNA から成り立ち、分子量の大きい方から順に RNA1、RNA2 及び RNA3 と呼ばれている。RNA 1~3 にはそれぞれ 1a、2a、2b、3a、3b (CP) の 5 つのタンパク質をコードしている (Ding et al., 1994; Palukaitis et al., 1992)。また、この他にサテライト RNA と呼ばれる 330~400 塩基からなる低分子の RNA を含む CMV の存在が知られている。サテライト RNA はウイルス RNA が複製する環境下でのみ増殖可能であり、CMV 自体の感染・増殖には必要のない RNA であるが、病徴発現に様々な影響を与える。例えば、CMV によるとまとのえそ症状に関与するサテライト RNA の存在が証明されている (Devic et al., 1989)。また、とまとにえそを生じないサテライト RNA や、白葉を生じる CMV-WL のサテライト RNA など、CMV の生物学的性質に関与するいくつかのサテライト RNA の存在が明らかにされている (Gonsalves et al., 1982)。

CMV には宿主範囲や病徴の違いから数多くの系統が報告され、血清学的性質の違いから、サブグループ I とサブグループ II に大別されており、これらのサブグループ間の全塩基配列の相同性は 75%程度である (Palukaitis et al., 1992)。また、一般に、サブグループ I に属する分離株はサブグループ II よりも病原性が強い (Wahyuni et al., 1992; Zang et al., 1994)。さらに、RNA2 及び CP 遺伝子の分子系統学的研究によりサブグループ I が IA と IB に分類されている (Roossinck et al., 1999)。

また、CP などの CMV 遺伝子のアミノ酸変異が病徴発現に大きな影響を与えることが明らかにされている (Shintaku et al., 1992; Chen and Francki, 1990; Suzuki et al., 1995)。例えば、CMV のサブグループ I に属する CMV-Y と CMV-O ではタバコなどでの病徴が大きく異なるが、CP の N 末

端から 129 番目のアミノ酸 1 個を置換するだけで、両者の病原性は相互に大きく変化する (Suzuki et al., 1995)。

CMV の RNA2 にコードされている 2b は 2a タンパク質の Open Reading Frame (ORF) に重複してコードされており、ORF 発見当初その機能は不明であったが (Ding et al., 1994)、その後 CMV の長距離移行や病原性に関与することが明らかとなった (Ding et al., 1995; Soards et al., 2002; Shi et al., 2002, 2003; Lewsey et al., 2009)。このように CMV の病原性にはサテライト RNA の性質やサブグループの違い、CP の変異、2b の機能など複数の要因が関わっており、宿主植物によっても病原性が異なるなど、病徴発現の機構は複雑である。

神奈川県内ではこれまでに各種の農作物から主要な病原ウイルスとして CMV が分離・同定されている。青野ら (1968) はキュウリ及びメロンにおけるウイルスを同定して発生消長を調査し、多数の検体から CMV が分離されたことを報告している。また、トマトやナス、トウガラシなど多くの野菜類や、シクラメンなどの花き類から CMV が検出されており、CMV は神奈川県の野菜や花き類における重要なウイルス病の一つとなっている (宇田川, 1996)。

2010 年、神奈川県平塚市内の施設トマトの葉に壞疽を伴ってモザイク症状を示し、生育が抑制される株が発生し、その病徴から CMV の感染が疑われた。この株からウイルスの分離を試みたところ、CMV のマイルド系統 (CMV-KT) が分離された (野村ら, 2012)。本節では分離した CMV の病原性や血清関係などの特性について、サブグループ I に属し、シロイヌナズナや *N. benthamiana* を含む多くの植物に激しい病徴を示す CMV-Y、及びサブグループ II に属し、シロイヌナズナや *N. benthamiana* などに病徴を示さない CMV-TN と比較することにより調べた。

2. 材料及び方法

(1) 汁液接種試験

トマト(桃太郎)の病葉にリン酸緩衝液 (pH7.0) を加えて磨砕し、カーボランダム法により *Chenopodium quinoa* に汁液接種した。生じた単一局部病斑を分離し、同様に *N. benthamiana* に汁液接種した。接種後の上葉を再び接種源とし、6 科 16 種の検定植物に汁液接種してその反応を調べた。また、タバコ、*N. glutinosa*、*N. benthamiana*、トマト及びシロイヌナズナに対する反応についてサテライト RNA を含まない CMV-Y 及び CMV-TN (東北大学高橋教授より病葉を分譲) と比較した。接種した植物は 25°C、12 時間日長のグロースチャンバーで育成した。

(2) ウェスタンブロット

CMV-Y 抗血清 (日本植物防疫協会) を使用し、CMV-KT の反応をウェスタンブロット法により CMV-Y と比較した。CMV はタバコの感染葉を接種源としてシロイヌナズナに汁液接種し、接種後に展開してきた上葉をマイクロチューブに収集した。これに 2 倍量の SDS-サンプルバッファーを加えて磨砕後、5 分間煮沸し、10,000 ×g で 5 分間遠心して得た上清をサンプルとした。ウェスタンブロットによるシグナルの検出は第 2 章に記載した方法に従って行った。

(3) CMV 遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

CMV のサブグループ I に属する CMV-O と CMV-Y、及びサブグループ II に属する CMV-Q と CMV-WL の塩基配列を基に、遺伝子解析ソフト OLIGO(Molecular Biology Insight)を用いて CMV の 2b 遺伝子領域を含む RNA2 及び CP 遺伝子領域を含む RNA 3 を増幅するためのプライマーを製作した。RNA2 を増幅するためのフォワードプライマーには CMV.RNA2F1 (5'-TCGAGTTGAAA TACAAGAAG-3')及びリバープライマーには CMV.RNA2R1 (5'-TGGTCTCCTTATGGAGAACC -3')を用いた。また、RNA 3 を増幅するためのフォワードプライマーには CMV.RNA3F1 (5'-GAG CAAACAAAACCGTCAGC-3') 及びリバープライマーには CMV.RNA3R1 (5'-TGGTCTCCTTTT GGAG-3')を用いた。RT-PCR には RNA LA PCR キット (TaKaRa) を使用した。CMV-KT を汁液接種して発病したタバコの病葉から全 RNA を抽出して鋳型とし、リバープライマーにより 49°C、30 分間逆転写を行った。その後、フォワードプライマーを加えて PCR を行うことにより RNA2 及び RNA3 の増幅断片を得た。PCR の反応条件は、RNA2 では熱変性 94°C、30 秒、アニーリング反応 56°C、30 秒、伸長反応 72°C、30 秒で 30 サイクル反応させた。RNA3 では熱変性 94°C、30 秒、アニーリング反応 52°C、30 秒、伸長反応 72°C、1 分で 35 サイクルとした。PCR 産物の精製、pT7Blue-T-Vector へのクローニングは第 2 章に記載した方法で行った。塩基配列を決定後、BLAST 及び遺伝子解析ソフト DNASIS (日立) を用い、CMV の各系統との相同性を比較した。

(4) サテライト RNA の検出

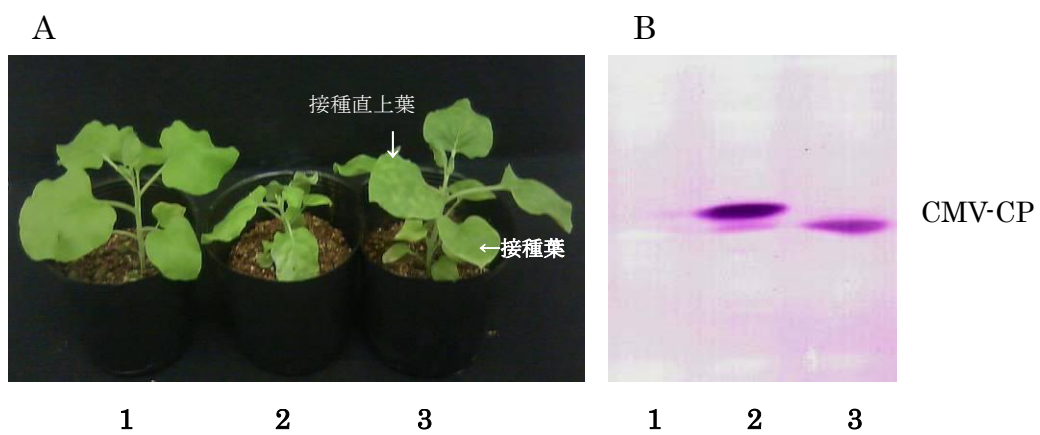
CMV-KT におけるサテライト RNA の有無を RT-PCR 及びノーザンブロットにより調べた。対象として、サテライト RNA を持つ CMV-TN (+satellite) (東北大学 高橋教授から分譲)を用いた。CMV-TN (+satellite) を感染させたタバコから全 RNA を抽出し、RT-PCR によりサテライト RNA を検出した。プライマーにはサテライト RNA のユニバーサルプライマーとして報告されている Sat-A (5'-AAGGATCCGTTTTGTTTG(A, T)T(A, G)GAGAATTGCG(C, T)(A, G)GAG-3')及び Sat-B (5'-AAGGATCCGGTTCCTG(C, G, T)(A, G, T)(A, G, T)(A, G, T)GGAATG-3')を用いた (Grieco et al., 1997)。逆転写には Sat-B を用い、49°C、30 分間の反応後、99°C、5 分間処理して逆転写酵素を不活化させた。PCR 反応にはフォワードプライマーとして Sat-A を加え、熱変性 94°C、30 秒、アニーリング反応 52°C、30 秒、伸長反応 72°C、30 秒で 35 サイクル反応させた。PCR 産物は第 2 章に記載した方法に準じて pT7Blue-T-Vector にクローニングした。また、塩基配列を確認後、サテライト RNA の cDNA をクローニングしたプラスミドを鋳型に、プライマーとして Sat-A 及び Sat-B を用い、DIG 標識した PCR プロブを合成した。CMV-TN 及び CMV-KT を汁液接種して感染させたタバコから全 RNA を抽出し、サテライト RNA を標的とした DIG-PCR プロブを用い、第 3 章で記載した方法によりノーザンブロットを行った。

2. 結果及び考察

(1) CMV-KT の病原性

供試分離株を *N. benthamiana* に接種し、その後に上葉から得た試料についてウエスタンブロット解析を行ったところ、CMV 抗体と明確な反応を示し、CMV であることが確認されたため、本分離株を CMV-KT とした。CMV-KT は CMV-Y より検出シグナルのレベルが低いとともに、分子量がやや小さいなど、両者間に生化学的な差が認められた (第 23 図 B)。

汁液接種試験では CMV-KT は *N. benthamiana* に全身感染し、接種直上葉には弱いモザイク症状が確認されたが、それ以外の上位葉では明確な病徴は認められなかった (第 24 図 A)。この弱いモザイク症状を示す接種直上葉を接種源として検定植物に汁液接種したところ、トマトやタバコに全身感染するものの、いずれも病徴は弱く、*N. benthamiana* と同様に接種直上葉には弱いモザイクが認められたが、その後無病徴の葉が展開した。*N. glutinosa* では CMV-Y よりは弱いものの、比較的明瞭なモザイク症状を示した。CMV-KT を接種したタバコ、*N. benthamiana* 及びトマトなどの植物における接種直上葉の病徴は CMV-TN より明確であった (第 13 表)。一方、シロイヌナズナでは、CMV-Y に感染した場合には激しいモザイク・萎縮症状を示すが、CMV-KT では健全植物と比べてわずかに生育が抑制されるものの、モザイクや萎縮などの病徴は認められなかった (第 13 表)。なお、*N. benthamiana* 及びタバコの上葉を *C. quinoa* に接種したところ、モザイク症状を示す接種直上葉では局部病斑が認められたが、モザイク症状発病後に展開した無病徴葉では局部病斑は形成されなかった。CMV-KT のその他の検定植物に対する反応は、ピーマンでは葉に明瞭なモザイク症状を生じるとともに株全体が萎縮し、*Physalis floridana* では上葉にモザイク症状が発生した。センニチコウ、*C. amaranticolor*、*C. quinoa*、ソラマメ及びササゲでは接種葉に局部病斑を生じた。これに対し、キュウリ (相模半白)、ダイコン (耐病総太り)、キャベツ (金春)、カブ (覆下相模) ではいずれも感染が認められなかった (第 14 表)。これらの結果から、CMV-KT はトマト等に対する病原性が弱いマイルド系統であるが、一部の植物種には明瞭な病徴を示すことが明らかとなった。CMV の病徴は宿主植物によって大きく異なる場合があり、埼玉県のコウレンソウ縮葉症状株 (CMV-SR) は、多くの植物で病徴が軽く、特にトマト、キュウリ、タバコなどには全身感染するが、病徴を生じない。この、CMV-SR はトマトの弱毒ウイルスとして有効であるが、コウレンソウ、ピーマンなどには病徴を生じることが示されている (善林ら, 1986)。このように CMV-KT における病原性の特性は、既知の CMV 弱毒系統として報告されている CMV-SR (善林ら, 1983) や CMV-P (栃原ら, 1976) などとも類似していた。



第 24 図 CMV に感染した *Nicotiana benthamiana* の病徴(A)とウエスタンブロット(B)による CMV の検出.

1. 健全植物; 2. CMV-Y 感染植物; 3. CMV-KT 感染植物

第 13 表 検定植物の供試ウイルスに対する反応

植物(品種・系統名)	病 徴		
	CMV-KT	CMV-TN	CMV-Y
タバコ(<i>Xanthi nc</i>)	-/m ^{a)}	-/-	-/M,d
<i>N.glutinosa</i>	-/m	-/m	-/M,d
<i>N.benthamiana</i>	-/m	-/-	-/M,d
トマト(桃太郎)	-/m	-/-	-/M,d
シロイヌナズナ(Col-0)	-/-	-/-	-/M,d

a) 接種葉/接種直上葉の病徴を表す。M.モザイク, m.弱いモザイク, d.萎縮, -.無病徴

第 14 表 各種検定植物の CMV-KT に対する反応

接种植物(品種)	病徴	ウイルスの増殖
ヒユ科		
センニチコウ(<i>Gomphrena globosa</i>)	NS/- ^{a)}	+/+ ^{b)}
アカザ科		
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	N/-	+/-
<i>C. quinoa</i>	N/-	+/-
ウリ科		
キュウリ (<i>Cucumis sativus</i> ; 相模半白)	-/-	+/+
アブラナ科		
ダイコン(<i>Raphanus sativus</i> ; 耐病総太り)	-/-	-/-
キャベツ(<i>Brassica oleracea</i> ; 金春)	-/-	-/-
カブ(<i>B.campestris</i> ; 覆下相模)	-/-	-/-
シロイヌナズナ(<i>Arabidopsis thaliana</i> ; Col-0)	-/-	+/+
マメ科		
ソラマメ(<i>Vicia faba</i> ; 早生)	NS/-	+/-
ササゲ(<i>Vigna unguiculata</i> ; 黒種三尺)	N/-	+/-
ナス科		
<i>Nicotiana tabacum</i> (<i>Xanthi nc</i>)	-/-	+/+
<i>N. glutinosa</i>	-/m	+/+
<i>N.benthamiana</i>	-/-	+/+
トマト (<i>Solanum lycopersicum</i> ; 桃太郎)	-/-	+/+
ピーマン(<i>Capsicum annum</i>)	-/M,d	+/+
<i>Physalis floridana</i>	-/m	+/+

a) 接種葉/上葉の病徴を表す。N.えそ、NS.えそ斑点、M.モザイク、m.弱いモザイク、
d.萎縮、-無病徴

b) ウエスタンプロットにおける反応の有無を表す。+:反応あり、-:反応なし

(2) CMV 系統間における CP 及び 2b 遺伝子の相同性

RT-PCR により得られた RNA3 の CP 遺伝子を含む 1.5knt 領域の塩基配列を決定後、CMV 各系統の CP 遺伝子との相同性を比較した。その結果、CMV-KT の CP 遺伝子と CMV のサブグループ I に属する CMV-Y、CMV-O の CP 遺伝子とはそれぞれ 77.2%及び 76.1%の相同性であった。一方、サブグループ II に属する CMV-Q、CMV-TN とはそれぞれ 97.1%及び 98.2%の高い相同性を示した (第 15 表)。このように、CMV-KT はサブグループ II に属する CMV と CP 遺伝子の相同性が高いことからサブグループ II に属すると判断できる。一般に、サブグループ II に属する CMV の系統はサブグループ I と比較するとタバコ等に対する病原性が弱いことが知られており (Palukaitis et al. 1992; Zang et al. 1994)、この点でも CMV-KT は既報の CMV の特性と一致している。

CMV の病原性には CP などの他、2b の性質が関与することが知られている。そこで CMV-KT の 2b と病原性との関係を推定するため、CMV の RNA2 を増幅するプライマーセット (CMV.RNA2F1、CMV.RNA2R1) を用いた RT-PCR により 0.8knt の増幅産物をクローニングし、2b 遺伝子の塩基配列を決定した (ジーンバンク登録番号: AB709965)。CMV の各種系統と 2b 遺伝子の相同性を比較した結果、サブグループ I に属する CMV-Y 及び CMV-O とはそれぞれ 61.0%及び 60.7%であったが、サブグループ II に属する CMV-Q 及び CMV-TN とはそれぞれ 98.3%及び 99.0%と高い相同性を示した (第 15 表)。CMV-KT の 2b 遺伝子と CMV-Q 及び CMV-TN の 2b を推定アミノ酸レベルで比較すると、CMV-Q との間には 4 塩基置換が認められるものの、このうち 2 か所については L17H 及び I51F のアミノ酸変異が確認されたが、他の 2 か所についてはアミノ酸変異を伴わないサイレント変異であった。また、CMV-TN との間には 2 か所の塩基置換が認められたが、これらはいずれもサイレント変異であった。これらの結果から、CMV-KT と CMV-TN の間に認められた病原性の違いは、2b の性質の違いによるものではないことが推察された。

第 15 表 供試株(CMV-KT) と CMV 系統間における CP 遺伝子の相同性

CMV 系統	CMV-KT	CMV-Q	CMV-TN	CMV-Y	CMV-O
CMV-KT	100	97.1	98.2	77.2	76.1
CMV-Q		100	99.2	77.1	76.3
CMV-TN			100	76.9	76.1
CMV-Y				100	97.1
CMV-O					100

CMV-CP 遺伝子 (RNA3) の GenBank 登録番号. CMV-KT (AB709966), CMV-Q(M21464) , CMV-TN (AB176847), CMV-Y (D12499), CMV-O (D00385)

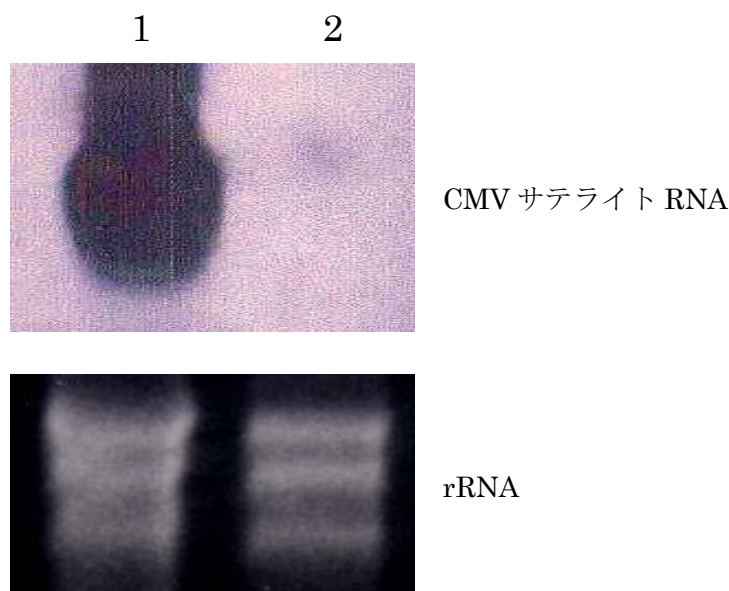
第 16 表 供試株(CMV-KT) と CMV 系統間における 2b 遺伝子の相同性

CMV 系統	CMV-KT	CMV-Q	CMV-TN	CMV-Y	CMV-O
CMV-KT	100	98.3	99.0	61.0	60.7
CMV-Q		100	98.0	60.7	59.8
CMV-TN			100	60.4	60.1
CMV-Y				100	98.8
CMV-O					100

CMV-2b 遺伝子 (RNA2) の GenBank 登録番号 . CMV-KT(AB709965), CMV-Q(X00985), CMV-TN(AB176848), CMV-Y(D12538), CMV-O(D10209) .

(3) サテライト RNA の検出

CMV-KT の単独接種では、トマトに弱い病原性しか示さなかったが、CMV-KT を分離したトマトでは明瞭な壊疽を伴うモザイク症状が認められていた。トマトの壊疽症状などの病徴には CMV のサテライト RNA が関与することが知られている (Devic et al., 1990)。そこで CMV-TN (+satellite) 及び CMV-KT 接種植物からそれぞれ全 RNA を抽出し、CMV-TN (+satellite) のサテライト RNA をプローブにノーザンブロットを行った。その結果、対照の CMV-TN (+satellite) を接種した植物からはサテライト RNA が明確なシグナルとして検出されたが、CMV-KT を接種した植物からは検出されなかった (第 25 図)。汁液接種試験や CP の塩基配列の相同性、サテライト RNA などの実験結果は、本ウイルスを分離した圃場におけるトマトの壊疽症状は、CMV-KT の単独感染によるものではない可能性を示唆している。実際、CMV と他の Potyvirus などとの混合感染が病徴を激化することが知られており (Sano and Kojima, 1989; Wang et al., 2002)、CMV-KT の病徴への関与についてさらに検討が必要と考えられた。



第 25 図 CMV-TN (+satellite)及び CMV-KT 感染に感染したタバコからのノーザンブロットによるサテライト RNA の検出.

1. CMV-TN (+satellite) 2. CMV-KT

第2節 TuMV 抵抗性形質転換体の他のウイルス感染による RNA サイレンシングの抑制

1. 緒言

CMV がコードするタンパク質の機能についてはこれまでに詳細な研究が進められており、特に RSS である 2b について解析されており、RNA サイレンシング機構における Argonaute1 及び small RNA と結合することで RSS 活性を示すことなど、その機能が解明されてきた (Zang et al., 2006; Goto et al., 2007; González et al., 2010)。また、多くの植物ウイルスで RSS が同定され、その機能解析が進められるようになった (Voinnet et al., 2000; Vargason et al., 2003)。

植物ウイルスが持つ RSS が RNA サイレンシングによるウイルス抵抗性に影響を与えることが報告されており、CMV 強毒株が形質転換植物におけるウイルス抵抗性を打破することが示されている (Mitter et al., 2003; Simón-Mateo et al., 2003)。また、ジャガイモ A ウイルス (PVA, potato virus A) の CP 遺伝子を導入した *N.benthamiana* の PVA 抵抗性が PVY の感染によって打破されることが報告されている (Savenkov and Valkonen 2001)。しかし、どのようなウイルス抵抗性植物とウイルスの組み合わせであれば抵抗性打破が起こるのか、また、ウイルス感染後に抵抗性が打破され、ウイルス感染が可能になるまでの生育ステージなどについては不明な部分が多い。そこで本節では TuMV-CP を導入した TuMV 抵抗性形質転換体を用い、RSS の機能が解析されている主要ウイルスである CMV、PVY、及び PVX の TuMV 抵抗性に対する影響について調べた。

2. 材料及び方法

(1) 形質転換植物

シロイヌナズナでは TuMV-CP 遺伝子を導入した TuMV 抵抗性形質転換体として 3 系統 (*AtCP112-R1*、*AtCP202-R1*、*AtCP232-R1*) (以下 TuR-*AtCP*) を、また、*N.benthamiana* では TuMV-CP 遺伝子を導入した TuMV 抵抗性形質転換体として *NbCP12-R1* 系統及び感受性形質転換体として *NbCP10-S1* 系統を用いた。

(2) ウイルス

形質転換植物における TuMV 抵抗性が他のウイルス (1 次ウイルス) によって打破され、TuMV (2 次ウイルス) が感染できるようになるかどうかを調べるためには、1 次ウイルスの性質として供試植物に全身感染しても病徴が弱い、または発病しても植物体が生育し、2 次ウイルスが接種可能な生育を示し、その後の病徴を判別できる必要がある。そこで TuR-*AtCP* に対する 1 次ウイルスには、シロイヌナズナに全身感染するが、ほとんど病徴を示さない CMV-KT を用いた。*N.benthamiana* は CMV の他、PVY や PVX などシロイヌナズナに感染しないウイルスに対する感受性が高い。そこで *NbCP12-R1* に対しては、CMV-KT の他、PVY-K1 (牛山ら 1991) 及びウイルスベクターである pBR106 (Baulcombe 博士より分譲) 由来の PVX (以下 PVX-pGR106) を供試した。2 次ウイルスとして TuMV-JO 及び TuMV の感染性クローン由来で、NiB と CP の間に GFP 遺伝子が挿入されており、感染植物において GFP 蛍光が観察できる TuMV (以下 TuMV-GFP) (宇都宮大学夏秋教授より分譲) を供試した。

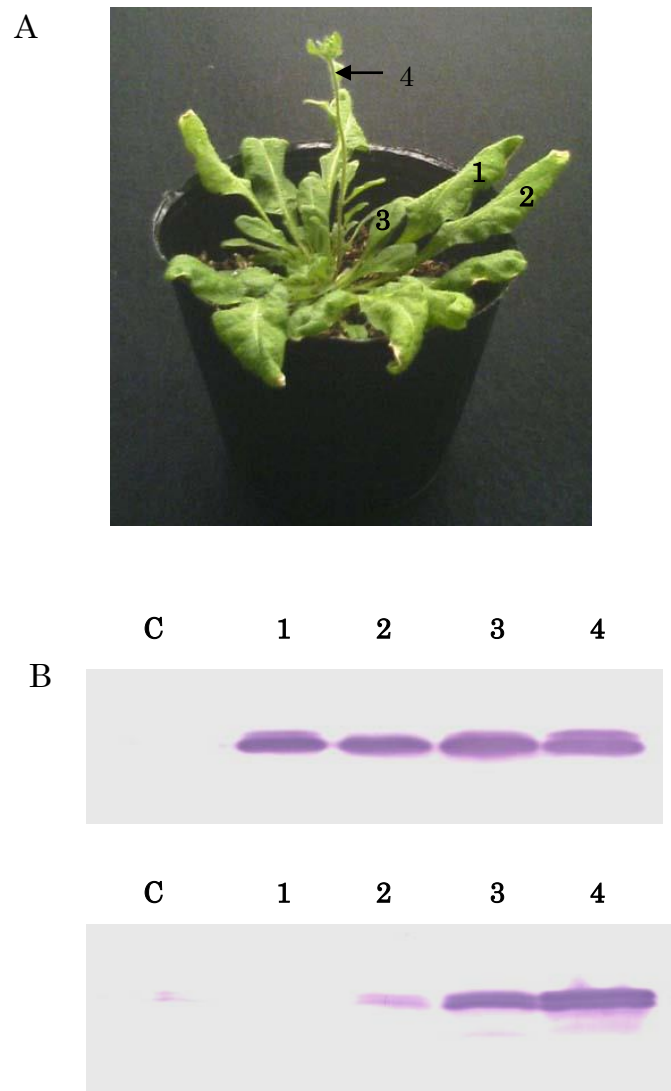
(3) ウイルスの検出

CMV-KT、PVY-K1 及び PVX-pGR106 の感染は第 2 章で記載した手法に基づき、ウエスタンブロットにより確認した。PVY と PVX の抗体には日本植物防疫協会のものを用いた。また、TuMV については第 3 章で記載した手法に基づき、Nib 遺伝子を検出できる NibF2 及び NibR を用いた。TuMV-GFP については蛍光実体顕微鏡 (ライカ) で GFP 蛍光を観察した。

3. 結果

(1) シロイヌナズナの TuMV-CP 遺伝子形質転換体に対する CMV-KT による RNA サイレンシングの抑制

CMV-Y に感染したシロイヌナズナは激しいモザイク・萎縮症状を示すのに対し、CMV-KT に感染したシロイヌナズナでは健全植物と比べてわずかに矮化するものの、モザイクや萎縮などの病徴は認められない。そこでこれらの CMV を TuMV 抵抗性の *AtCP* 系統 (TuR-*AtCP*) 及び非形質転換体 (Col-0) に接種した後、TuMV-CP の発現レベルをウエスタンブロットにより検出することで RNA サイレンシング抑制レベルを比較した。まず、TuR-*AtCP* における CMV-KT 接種後の生育部位別に TuMV-CP の発現レベルを調べた。接種葉、成葉、展開葉、及び抽苔部における TuMV-CP の検出レベルを比較したところ、TuMV-CP は接種葉からは検出されず、成葉では検出レベルが低く、展開葉及び抽苔部では高かった (第 26 図)。CMV が感染した場合、RNA サイレンシングは生長点や新展開葉で強く抑制されることが知られており (Béclin et al 1998; Voinnet et al 1999)、本研究でも CMV-KT を接種後に展開してきた上葉において TuMV-CP の発現レベルが高く、RNA サイレンシングが強く抑制されていた。そのため、TuR-*AtCP* における RNA サイレンシング抑制レベルの評価には CMV 接種後の展開葉を用いて行った。CMV-Y もしくは CMV-KT を接種して 10 日後の上葉について、CMV の感染をウエスタンブロットにより確認するとともに TuMV-CP の発現レベルを調べたところ、CMV を接種していない TuR-*AtCP* からはいずれも TuMV-CP は検出されないが (第 27 図 B, C lanes 4~6)、CMV-Y が感染し、モザイク・萎縮症状を示した個体ではいずれもサイレンシングが抑制され、導入遺伝子由来の TuMV-CP が検出された (第 27 図 A, B lanes 7~9)。また、CMV-KT が TuR-*AtCP* に感染した植物では CMV-Y のような病徴は認められないものの、RNA サイレンシングが抑制され、TuMV-CP の発現が認められた (第 27 図 A, B lanes 10~12)。



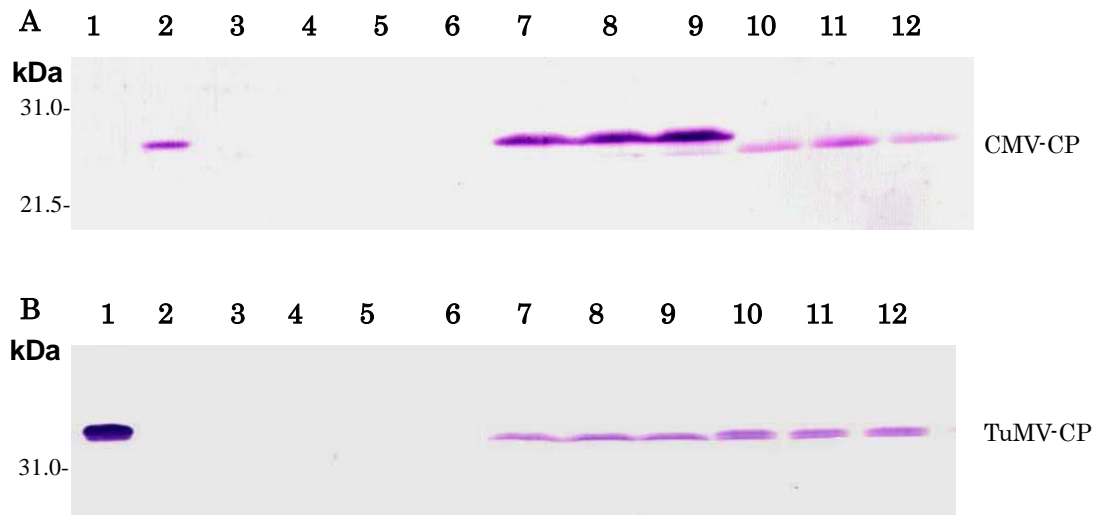
第 26 図 CMV-KT 感染形質転換シロイヌナズナ(*AtCP112-R1*)における部位別 RNA サイレンシング抑制レベルの比較.

A: ウェスタンブロットのサンプル部位

B: CMV(上)及び TuMV(下) 抗体を用いたウェスタンブロット解析.

C, CMV 接種前の植物; 1, CMV 接種葉; 2, CMV 接種葉と同ステージの成葉;

3, CMV 接種後の展開葉; 4, CMV 接種後の抽苔部.



第 27 図 CMV に感染した TuMV 抵抗性シロイヌナズナ形質転換体における TuMV-CP のウエスタンブロット解析.

A: CMV-Y(レーン 2,7~9) 及び CMV-KT(レーン 10~12) のウエスタンブロットによる検出.

B: TuMV-CP のウエスタンブロットによる検出.

1, TuMV に感染した Col-0; 2, CMV-Y に感染した Col-0; 3, Col-0(健全植物); 4, *AtCP112-R1*(健全植物); 5, *AtCP202-R1*(健全植物); 6, *AtCP232-R1*(健全植物); 7, *AtCP112-R1*(CMV-Y 感染植物); 8, *AtCP202-R1*(CMV-Y 感染植物); 9, *AtCP232-R1*(CMV-Y 感染植物); 10, *AtCP112-R1*(CMV-KT 感染植物); 11, *AtCP202-R1*(CMV-KT 感染植物); 12, *AtCP232-R1* (CMV-KT 感染植物).

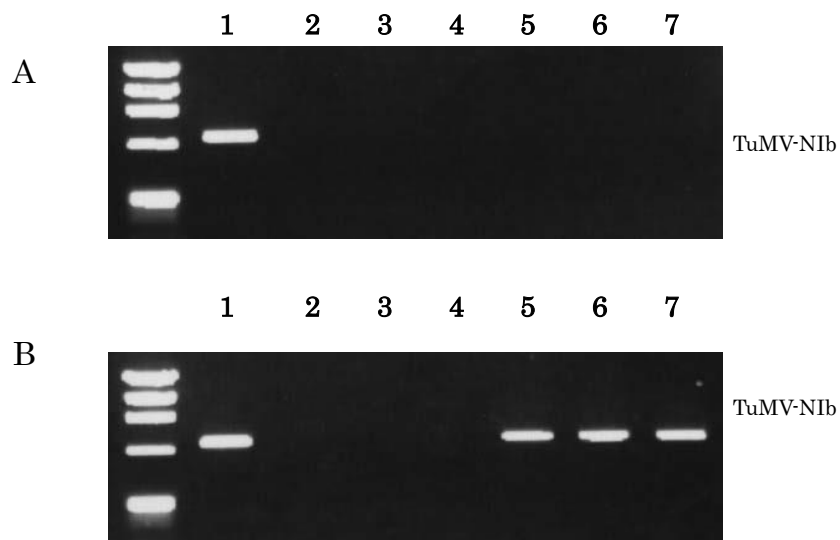
(2) CMV-KT を接種したシロイヌナズナ形質転換体の TuMV に対する反応

CMV-KT 感染による TuMV 抵抗性打破の検討を行うため、TuR-*AtCP* の 3 系統 (*AtCP112-R1*、*AtCP202-R1*、*AtCP232-R1*) に 1 次ウイルスとして CMV-KT を汁液接種した 7 日後に CMV 抗血清を用いたウエスタンブロットにより CMV-KT の感染を確認した後、1 次ウイルスを接種した葉と同じ生育ステージの葉 (成葉) に 2 次ウイルスとして TuMV-JO を接種した。もしくは、1 次ウイルス接種 14 日後に新たに展開してきた上位葉 (展開葉) に 2 次ウイルスを接種した。なお、対照植物として非形質転換体 (Col-0) を用いた。それぞれの実験区で 2 次ウイルスを接種してから 2 週間後に上位に展開してきた葉から RNA を抽出し、RT-PCR により TuMV 感染の有無を検定した。RT-PCR のプライマーには導入した CP 遺伝子に由来する mRNA と 2 次ウイルスとして接種した TuMV の RNA を区別するため、第 3 章で記載した手法に基づき、NIB 遺伝子を検出できるプライマーとして設計した NIBF2 及び NIBR を用いて行った。

その結果、成葉へ 2 次ウイルスを接種した場合、いずれの系統においても病徴は認められなかったが、展開葉に TuMV を接種した植物の中に対照の非形質転換体と同様の病徴を示す個体が確認された (第 28 図 B)。2 次ウイルス接種後の植物について RT-PCR により TuMV を検出したところ、接種後に病徴が認められない個体からは TuMV は検出されなかったが、発病してモザイク・萎縮症状を示した個体からはいずれも TuMV が検出された (第 29 図 B lanes5~7)。2 次ウイルス接種部位別の感染率を比較すると、成葉への接種では TuR-*AtCP* のいずれの系統でも感染個体が認められず、TuMV が検出されなかったのに対し、展開葉へ接種した場合に *AtCP112-R1* では 20 個体中 8 個体 (40%)、*AtCP202-R1* 及び *AtCP232-R1* ではいずれも 12 個体 (60%) が病徴を示し、これらの個体からは TuMV が検出された (第 17 表)。これらの結果から、TuR-*AtCP* の導入遺伝子に対する RNA サイレンシングが CMV-KT の感染により特に展開葉において強く抑制され、TuMV 抵抗性が打破されて TuMV の感染・増殖が可能になることが確認された。



第 28 図 CMV-KT に感染した TuMV 抵抗性形質転換シロイヌナズナの TuMV に対する反応.
A: TuMV に感染した非形質転換体.
B: CMV-KT 接種 14 日後の展開葉に TuMV を接種し、発病した *AtCP112-R1*.
C: CMV-KT 接種 7 日後の成葉に TuMV を接種した *AtCP112-R1*.



第 29 図 TuMV 接種部位の違いによる CMV-KT 感染形質転換シロイヌナズナからの RT-PCR による TuMV の検出.

A: 成葉への TuMV 接種. B: 展開葉への TuMV 接種.

1, 非形質転換体; 2, 形質転換体 (*AtCP112-R1*); 3, 形質転換体 (*AtCP202-R1*);
 4, 形質転換体 (*AtCP232-R1*); 5, CMV-KT に感染した形質転換体(*AtCP112-R1*) ;
 6, CMV-KT に感染した形質転換体(*AtCP202-R1*) ; 7, CMV-KT に感染した形質
 転換体 (*AtCP232-R1*) .

第 17 表 CMV-KT に感染した TuMV 抵抗性シロイヌナズナ形質転換体の TuMV 接種
部位別感染率

接種部位	ライン	接種数	発病数	TuMV 検出数	感染率(%)
成	<i>AtCP112-R1</i>	20 ^{a)}	0	0	0
	<i>AtCP202-R1</i>	20	0	0	0
葉	<i>AtCP232-R1</i>	20	0	0	0
	Col-0	10	10	10	100
展	<i>AtCP112-R1</i>	20	8	8	40
開	<i>AtCP202-R1</i>	20	12	12	60
葉	<i>AtCP232-R1</i>	20	12	12	60
	Col-0	10	10	10	100

a) 数字は供試個体数を表す。

(3) CMV、PVY 及び PVX を接種した *N.benthamiana* 形質転換体の TuMV に対する反応

次いで、*N. benthamiana* を用いて試験を行った。TuMV-CP 遺伝子を形質転換し抵抗性を示す系統 *NbCP12-R1* 及び感受性系統 *NbCP10-S1* に 1 次ウイルスとして CMV-KT、PVY-K1 及び PVX-pGR106 を第 3~4 葉の展開期にそれぞれ汁液接種し、23°C、16 時間日長の蛍光灯下で育成した。各ウイルスを 1 次ウイルスとして接種してから 5 日後に接種葉と同じステージの成葉に、また、1 次ウイルス接種 10 日後及び 15 日後には接種後に展開した上葉に、2 次ウイルスとして TuMV の感染と局在性を視覚的に確認するため、TuMV-GFP を接種してその後の反応を調べた。2 次ウイルス接種 3 週間後に病徴を観察するとともに、GFP 蛍光を観察し、TuMV の感染状況を調べた。CMV-KT を単独接種した *N. benthamiana* 形質転換体では非接種個体に比べ接種後 2~3 週間後の生育がやや劣り、わずかにモザイク症状が認められるものの、CMV-Y を接種した時のように明確なモザイク・萎縮症状は認められなかった。1 次ウイルスとして CMV-KT を接種した後に 2 次ウイルスとして TuMV を接種した *NbCP12-R1* では、1 次ウイルス接種 5 日後の接種では TuMV は感染しなかったが、10 日後の接種では 20 個体中 6 個体 (30%)、15 日後の接種では 20 個体中 16 個体 (80%) が発病した (第 18 表)。これらの発病した個体における病徴は、TuMV 感受性系統である *NbCP10-S1* に TuMV を接種した場合よりもモザイク・萎縮症状などの発病が数日程度遅れるものの、2 次ウイルス接種 3~4 週間後にはほぼ同程度の病徴となった (第 30 図)。TuMV-GFP 接種後の個体について GFP 蛍光を観察したところ、1 次ウイルスを接種していない *NbCP12-R1* では接種葉、上葉ともに GFP は確認されず、感受性系統である *NbCP10-S1* では接種葉、上葉とも明確な蛍光が観察された。一方、CMV-KT 感染後に TuMV-GFP を接種した個体の発病葉について同様に GFP を観察したところ、葉の表面にスポット状の蛍光が確認され、感受性系統で見られるように上葉全体に広がった蛍光とは異なっていた (第 31 図)。

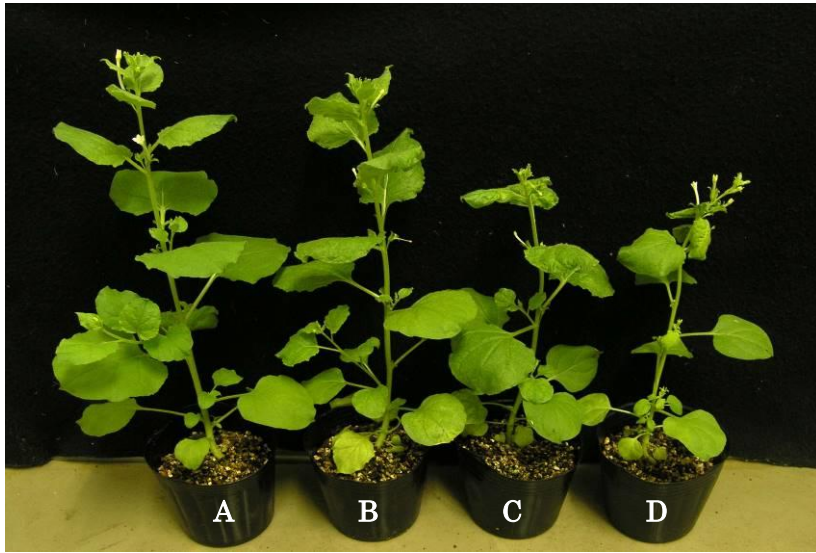
一方、PVY-K1 に感染した *N. benthamiana* には、接種後の上葉に明確な萎縮症状が認められた。1 次ウイルス接種 5 日、10 日及び 15 日後の上葉に TuMV-GFP を接種し、1~2 週間後に GFP を観察した (第 18 表)。その結果、*NbCP10-S1* では TuMV が混合感染し、激しい病徴が認められたが、*NbCP12-R1* に対しては 1 次ウイルス接種後の日数に関わらず、2 次ウイルスの接種葉及び上葉のいずれにも病徴及び GFP 蛍光は認められなかった。また、PVX-pGR106 を 1 次ウイルスとして接種した *N. benthamiana* では接種後に展開した葉には明確な萎縮症状が認められるが、生育に伴い回復し、その後展開してくる葉では明確なモザイク症状は認められなくなった。PVX-pGR106 を 1 次ウイルスとして接種後に病徴を示した上葉に TuMV-GFP を 2 次接種した場合、*NbCP10-S1* では激しい病徴が認められ、混合感染したが、*NbCP12-R1* に対しては PVY-K1 の場合と同様に、1 次ウイルス接種後の日数に関わらず接種葉及び上葉のいずれにも TuMV の病徴及び GFP 蛍光は認められなかった (第 18 表)。

第 18 表 CMV、PVY 及び PVX に感染した *Nicotiana benthamiana* 形質
 転換体 *NbCP12-R1* 及び *NbCP10-S1* における TuMV 感染率

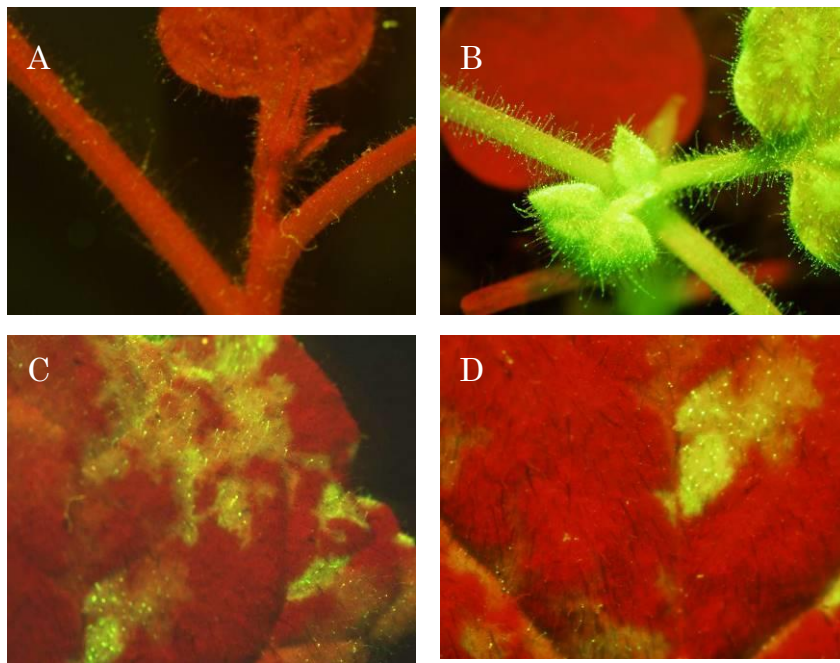
形質転換体 (1 次ウイルス)	2 次ウイルス接種までの日数 ^{a)}		
	5 日	10 日	15 日
<i>NbCP12-R1</i>			
(CMV-KT)	0/20 ^{b)}	6/20	16/20
(PVY-K1)	0/20	0/20	0/20
(PVX-pGR106)	0/20	0/20	0/20
<i>NbCP10-S1</i>			
(CMV-KT)	10/10	10/10	10/10
(PVY-K1)	10/10	10/10	10/10
(PVX-pGR106)	10/10	10/10	10/10

a) 1 次ウイルスとして各ウイルスを接種してから 2 次ウイルスである
 TuMV-GFP を接種するまでの日数を表す。

b) TuMV 感染個体数/接種個体数



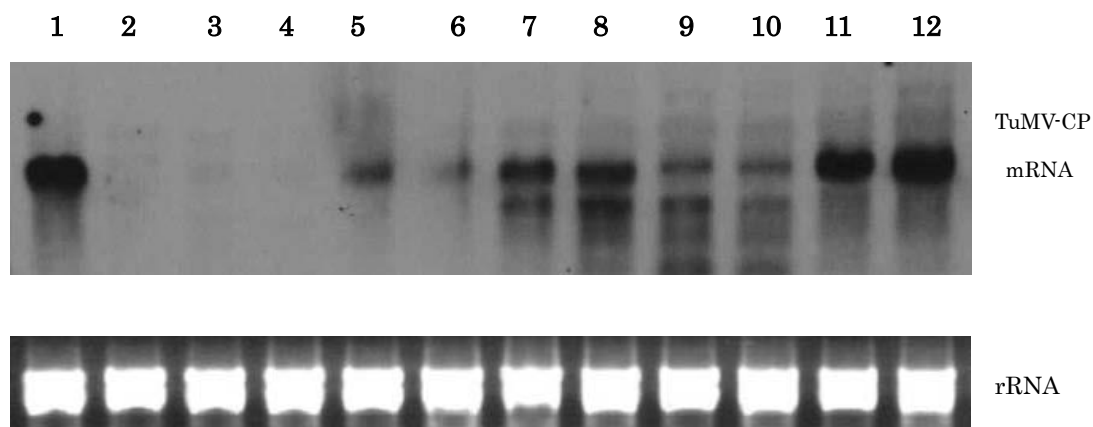
第 30 図 TuMV-GFP を接種した *Nicotiana benthamiana* 形質転換体の反応.
A : TuMV-GFP を接種した *NbCP12-R1*.
B : CMV-KT に感染した *NbCP12-R1*.
C : CMV-KT 感染後に TuMV-GFP を接種した *NbCP12-R1*.
D : TuMV-GFP に感染した *NbCP10*.



第31図 TuMV-GFPを接種した *Nicotiana benthamiana* 形質転換体に観察される GFP 蛍光.
A: TuMV-GFP を接種した *NbCP12-R1*.
B: TuMV-GFP に感染した *NbCP10-S1*.
C, D: CMV-KT 感染後に TuMV-GFP を接種した *NbCP12-R1*.

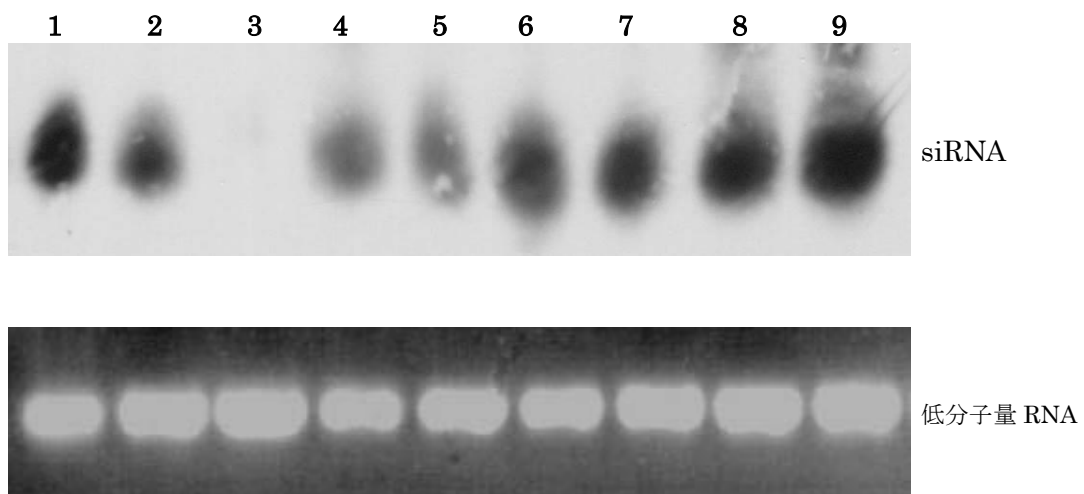
(3) 1次ウイルス接種後の *N. benthamiana* 形質転換体における CP-mRNA 及び siRNA の検出

NbCP12-R1 に CMV-Y、CMV-KT、PVX-pGR106 及び PVY-K1 を接種後、CP-mRNA の検出レベルを見ることによりウイルス間での RNA サイレンシング抑制レベルを比較した。その結果、CP-mRNA の検出レベルが最も高かったのは PVY-K1 であり (第 32 図 lanes 11, 12)、次いで CMV-KT (lanes 7, 8)、PVX-pGR106 (lanes 9, 10) の順であった。CMV 間で比較すると、*N. benthamiana* に対する病原性が強い CMV-Y よりも CMV-KT の方が CP-mRNA 検出レベルが高く (lanes 5~8)、ウイルス間または CMV 系統間でサイレンシング抑制レベルが異なっていた。同様に CMV-KT、PVX-pGR106 及び PVY-K1 感染後の植物について、TuMV-CP をプローブにして siRNA を検出したところ、CMV-KT で最も検出レベルが低く、次いで PVY-K1 であり、PVX-pGR106 が最も高かった(第 33 図 lanes 4~9)。



第 32 図 CMV、PVX 及び PVY に感染した TuMV 抵抗性 *Nicotiana benthamiana* 形質転換体のノーザンブロット解析.

- 1, *NbCP10-S1*; 2, 非形質転換体; 3, *NbCP12-R1*①; 4, *NbCP12-R1*②;
5, CMV-Y 感染 *NbCP12-R1*①; 6, CMV-Y 感染 *NbCP12-R1*②; 7, CMV-KT 感染 *NbCP12-R1*①; 8, CMV-KT 感染 *NbCP12-R1*②; 9, PVX-pGR106 感染 *NbCP12-R1*①;
10, PVX-pGR106 感染 *NbCP12-R1*②; 11, PVY-K1 感染 *NbCP12-R1*①;
12, PVY-K1 感染 *NbCP12-R1*②.



第 33 図 CMV、PVX 及び PVY に感染した TuMV 抵抗性 *Nicotiana benthamiana* 形質転換体から検出される siRNA.

- 1, *NbCP12-R1*①; 2, *NbCP12-R1*②; 3, *NbCP10-S1*; 4, CMV-KT 感染 *NbCP12-R1*; 5, CMV-KT 感染 *NbCP12-R1*②; 6, PVY-K1 感染 *NbCP12-R1*①; 7, PVY-K1 感染 *NbCP12-R1*②; 8, PVX-pGR106 感染 *NbCP12-R1*①; 9, PVX-pGR106 感染 *NbCP12-R1*②.

4. 考察

本章ではまず、神奈川県のとまとから、シロイヌナズナや *N. benthamiana* に対する病原性が弱い CMV のサブグループ II に属する CMV-KT を分離した (第 24 図、第 13 表)。次に第 3 章で作出した TuMV 抵抗性シロイヌナズナ形質転換体(TuR-*AtCP*)に CMV-KT を接種し、新展開葉において RNA サイレンシングを抑制するとともに、TuMV 抵抗性を打破する能力があることを示した (第 26 図、第 27 図)。また、TuMV 抵抗性の *N. benthamiana* 形質転換体 (*NbCP12-R1*) に CMV-KT の他、PVY-K1 及び PVX-pGR106 を接種し、TuMV 抵抗性に与える影響を調べたところ、いずれのウイルスも導入遺伝子に対する RNA サイレンシングを抑制するが、TuMV-CP の検出レベルは異なり、また、供試ウイルスの中では CMV-KT にのみ TuMV 抵抗性を打破する性質があることを明らかにした (第 18 表、第 30 図)。

TuR-*AtCP* を用いた実験では、CMV 接種後の植物における TuMV-CP の検出レベルはサプレッサーである 2b の RNA サイレンシング抑制能を反映していると考えられる(第 27 図)。一般に、サブグループ I に属する CMV はサブグループ II に属する CMV よりも強い病原性を示し、このような病原性の違いは 2b により決定されると考えられている (Shi et al., 2002)。また、アグロインフィルトレーション法により 2b の RSS 活性を比較した場合、サブグループ I に属する SD-CMV における 2b の RSS 活性はサブグループ II の Q-CMV よりも強いことが報告されている (Ye et al., 2009)。一方、PVX アンプリコンにより GFP の発現が抑制されたシロイヌナズナ形質転換体(Amp243)に、2b を発現するシロイヌナズナ形質転換体を交配することで 2b の RSS 活性を比較した場合、サブグループ I に属する CMV-Fny とサブグループ II に属する CMV-LS では病原性に違いがあるものの、2b の RSS 活性は同等であることが報告されている(Lewsey et al 2007)。本研究ではサブグループ II に属する CMV-KT が感染した TuMV 抵抗性形質転換体における TuMV-CP の検出レベルはサブグループ I に属する CMV-Y よりもやや高い傾向が認められた (第 26 図、第 31 図)。CMV-R 系統のようにサブグループ II に属する CMV でも宿主植物により激しい病徴や、新展開葉における強い RNA サイレンシング抑制能を示す系統も存在する (Salanki et al., 1997; Béclin et al., 1998)。また、サブグループ I に属する CMV では、2b 遺伝子の 1 塩基変異によってサプレッサー活性とともに病原性が弱まることが報告されている (Goto et al., 2007)。本研究では CMV-KT と CMV-Y の 2b における RSS 活性の直接的な比較解析は行っていないが、サブグループ II に属する病原性の弱い CMV であっても 2b の配列の差異により RSS 活性に違いがあり、CMV-KT の 2b は比較的高い RSS 活性を持つ可能性がある。

本研究において、CMV-KT が TuR-*AtCP* 及び *NbCP12R-1* における TuMV 抵抗性を打破する性質があることが明らかとなった (第 17 表、第 18 表)。このような CMV-KT による TuMV 抵抗性の打破は、ウイルス間の相乗作用の一種であると考えられる。CMV と Potyvirus の混合感染による相乗作用については多くの知見がある。TuMV と CMV のダイコンにおける混合感染では、CMV の増殖が TuMV によって助長され、激しいモザイク症状を引き起こすが、CMV 単独感染では無病徴である (Sano and Kojima, 1989)。また、CMV はウリ科植物の Potyvirus による病徴を激化させる(Wang et al., 2002)。このような Potyvirus と CMV の相乗作用におけるウイルス RNA の蓄積には 2b が関

与している (Mascia et al., 2010; Takeshita et al., 2012)。また、CMV のマイルド系統が TMV との混合感染により病徴を増強することが報告されており、CMV-Kin の 2b は、タバコモザイクウイルス (TMV) との混合感染によるタバコの病徴激化に大きく影響する (Siddiqui et al., 2011)。本研究で認められたように、CMV-KT の感染によって TuMV 抵抗性形質転換体における RNA サイレンシングが抑制されて TuMV の感染が可能となった。これには CMV-KT の 2b が関与する相乗作用によるものと考えられる。

N. benthamiana 形質転換体のノーザンブロット解析では CMV の他、PVY や PVX のいずれのウイルスに感染した *NbCP12R-1* から導入遺伝子由来する TuMV-CP の mRNA が検出されるようになることからこれらのウイルスが持つ RSS の働きにより RNA サイレンシングが抑制されていると判断できる (第 32 図)。しかしその検出レベルはウイルス間で異なっており、最も検出レベルが高いのは PVY-K1 に感染した植物、次いで CMV-KT に感染した植物であり、PVX-pGR106 と CMV-Y に感染した植物は同程度であった。この検出レベルは各ウイルスに感染した植物のサンプル収集部位における RNA サイレンシング抑制能を反映していると考えられるが、病徴を比較すると、最も激しいモザイク・萎縮症状を示すのは CMV-Y であり、次いで PVY-K1 であった。また、PVX-pGR106 と CMV-KT では感染初期の病徴は PVX-pGR106 の方が明瞭であることから、PVX-pGR106 の方が病原性は強いと判断された。このように、ウイルスの病原性と RNA サイレンシング抑制能は、ウイルス間においても必ずしも一致しないことが示された。

一方で、CMV-KT が *NbCP12R-1* に感染することにより TuMV に対する抵抗性を高い効率で打破した。しかし、PVY-K1 に感染した植物では TuMV-CP の mRNA 検出レベルは供試ウイルスの中で最も高かったのに対して、TuMV 抵抗性を打破しなかった。また、PVX-pGR106 の感染でも TuMV 抵抗性を打破しなかった。このように TuMV 抵抗性を打破する能力はウイルスの種類により異なり、本実験では CMV-KT でのみにその特性が認められた。これらの結果から、RNA サイレンシング抑制能があるウイルスであっても必ずしも形質転換植物におけるウイルス抵抗性を打破しないことが分かる。この結果は、PPV の NIb 遺伝子を導入した *N. benthamiana* の PPV 抵抗性を、CMV は打破したが、Potyvirus の TVMV は打破しないという報告とも一致する (Simón-Mateo et al., 2003)。一方、PVA の CP 遺伝子を導入した *N. benthamiana* の PVA 抵抗性が PVY 感染によって打破されることが報告されていることから (Savenkov and Valkonen, 2001)、PVY では系統によってもその性質が異なる可能性がある。

このようなウイルスによる RNA サイレンシング抑制レベルと病原性や、抵抗性を打破する能力の違いはウイルスが持つ RSS の機能の違いが関与することが推察される。RSS の機能はウイルスによって異なっている。RSS の多くは dsRNA 結合タンパク質であることが示されており、Potyvirus の HC-Pro、Tomovirus の P19、Closterovirus の P21 は長さ依存的に ds-siRNA に結合し、RISC 形成を介した RNA 切断を阻害する (Lakatos et al 2006)。また、HC-Pro は内在性の small RNA である microRNA (miRNA) にも結合し、その機能を阻害することで植物の形態形成に影響する。さらに、HC-Pro を発現する形質転換植物では、切断されない dsRNA が蓄積することから、Dicer-like タンパク質 (DCL) による dsRNA の切断過程も阻害すると考えられている (Mallory et al., 2001;

Dunoyer et al., 2004)。CMV の 2b は、HC-Pro より早い過程でのサイレンシングシグナルの全身移行を阻害すると考えられている。また、すでにサイレンシングが起こっている植物ではそれを解消することは出来ないが、これからサイレンシングが起こる過程で、2b は阻害的に働くと考えられている (Guo and Ding, 2002)。さらに、2b は ds-siRNA に結合すると共に、RISC の主要構成成分である AGO1 や AGO4 と結合してその機能を阻害することが報告されている (Zang et al., 2006; Goto et al., 2007; González et al., 2010; Duan et al. 2012)。また、PVX などのポテックスウイルスの RSS である TGBp1 は、dsRNA 合成経路を阻害することが示されている (Okano et al., 2014)。

本研究では、CMV-KT、PVY-K1 及び PVX-pGR106 の各ウイルスが感染した後の *Nb*CP12R-1 から TuMV-CP 由来の siRNA が一定のレベルで検出できることが確認された (第 33 図)。また、CMV-KT 感染後に TuMV-GFP を接種した *Nb*CP12R-1 では感受性植物に見られるような葉面全体に広がった GFP 蛍光は認められなかった (第 31 図)。これらのことから、いずれのウイルスに感染した植物においても RNA サイレncing が完全には解除されず、導入遺伝子由来する mRNA の分解反応は維持されていることが確認できる。したがって、CMV-KT 感染後に見られる TuMV 抵抗性打破は、導入遺伝子から形成される dsRNA の分解後に標的となるウイルス RNA との結合などの抵抗性反応に関与する過程が、CMV の感染により部分的に阻害されていることが推察される。また、CMV は RISC の活性を阻害すると考えられるため、RISC による標的 RNA 切断活性が阻害された可能性がある。一方、本研究で供試した PVY-K1 や PVX-pGR106 では TuMV 抵抗性を阻害できない。ノーザンブロットでは PVY-K1 は *Nb*CP12R-1 に感染した際の TuMV-CP 検出レベルが高く、siRNA の生成が抑制されていた (第 32 図、第 33 図)。このことは PVY-K1 の HC-Pro により mRNA 及び dsRNA の切断は、ある程度抑制されていることを示している。このように PVY-K1 が TuMV 抵抗性を打破しないのは、RNA サイレncing 抑制能が低いからではなく、TuMV 抵抗性が誘導された植物におけるウイルス RNA の特異的分解が PVY-K1 の感染により阻害されていないことによると考えられる。また、PVX は当初、RNA サイレncing 抑制能を持たないと考えられるなど、サブレッサー活性が弱いことが知られており (Voinnet et al., 1999)、本研究でも PVX-pGR106 が *Nb*CP12R-1 に感染した際の TuMV-CP 検出レベルは他のウイルスが感染した場合よりも相対的に低く、siRNA の検出レベルが高かった (第 31、32 図)。したがって、RSS 活性が弱く、TGBp1 による dsRNA 合成阻害など、その機能が他のウイルスとは異なるため、PVX-pGR106 の感染により TuMV 抵抗性に対する影響は受けないと考えられる。

形質転換植物におけるウイルス抵抗性の打破は、1 次ウイルスの RSS の機能や、異なる RSS の共存による相乗作用、1 次ウイルスと 2 次ウイルス遺伝子間の相同性などが関与する現象と考えられ、本研究では CMV-KT が TuMV 抵抗性に影響し、TuMV と混合感染することにより病徴の発現を助長していると考えられる。単独感染ではほとんど病徴を示さないようなウイルスであっても宿主の抵抗性反応に大きく影響する場合があるため、マイルド系統の CMV と他のウイルスとの混合感染における病徴への影響についてさらに解析を進める必要がある。

第5章 総合考察

遺伝子組換え技術を利用した分子育種は、目的とする形質だけを付与した作物を比較的短期間で得られるなどのメリットがあることから、1996年以降、世界的にその開発と利用が進められてきた。植物ウイルス抵抗性は、遺伝子組換え作物の対象形質として研究が進められ、CP遺伝子等を導入することでウイルス抵抗性植物を作出する試みが各種のウイルスについて行われ、パパイヤやスクワッシュなど一部の作物ではすでに実用化されており (Tennant et al., 1994; Fuchs et al., 1997)、CP遺伝子等の導入によるウイルス抵抗性品種の育成は実用的な遺伝子組換え農作物を作出するためには有効な手法の一つとなっている。CP遺伝子を導入した形質転換植物におけるウイルス抵抗性にはCPの発現が必要とされる場合があり、発現したタンパク質が関与する **protein mediated resistance** として報告されている (Germundsson et al., 2002; Bazzini et al., 2006)。一方、TEVやPVYなどのCP遺伝子を翻訳不可能な形で導入した場合でも抵抗性が付与されることが示されるとともに抵抗性個体の特性が解析され (Lindbo et al., 1992; Smith et al., 1994)、同様の現象が各種の植物ウイルスで報告された。以降、ウイルス抵抗性に関与するメカニズムについては植物における主要な防御機構であるRNAサイレンシングとして解明されてきた (Ding, 2000; Vance and Vaucheret, 2001; Waterhouse, 2001; Voinnet, 2004; Baulcombe, 2005; Lindbo and Dougerty, 2005)。本研究で作出したTuMV-CP遺伝子を導入したシロイヌナズナ形質転換体において、TuMV抵抗性を示したのはいずれもTuMV-CPを発現していない個体・系統であり、**protein mediated resistance** は認められなかった。また、TuMV-CPの他、CPやNIBの部分塩基配列、及びVPg遺伝子を導入した*N.benthamiana*からもTuMV抵抗性や回復型抵抗性を示す系統を獲得することができた。これらの抵抗性個体はいずれも導入遺伝子に由来するmRNAの発現が抑制されており、さらにsiRNAが検出されることなどから、本研究で得られた形質転換植物におけるTuMV抵抗性はいずれもRNAサイレンシングによるものであることが確認された。

ウイルス遺伝子を導入した形質転換体からは、対象とするウイルスが増殖できないような高度な抵抗性を示す植物が得られることから、実用的な作物における抵抗性育種を目的とする上でも有効な方法となっている。しかしその抵抗性も、様々な要因により影響を受ける2つの可能性がある。すなわち、①抵抗性がウイルスの系統特異的であり、抵抗性を打破できるウイルス系統が感染する可能性、②ウイルス抵抗性植物に、異なるウイルスが感染し、RNAサイレンシングが抑制されることで対象ウイルスが感染できるようになる可能性などである。本研究では主にTuMV-CP遺伝子を導入した形質転換体について、TuMV抵抗性系統の特性を解析するとともに、これらの課題について調べたことから、本章ではそれらの観点から若干の考察を加えたい。

1. TuMV抵抗性形質転換植物の特性

TuMV-CPを導入したシロイヌナズナ (*AtCP*) では、CPを発現する形質転換系統や、CP及びmRNAが検出されない系統が得られるなど、導入遺伝子の発現状態は形質転換系統によって異なっている。また、TuMV-CP遺伝子及びCPの3'末端側部分塩基配列を導入した*N.benthamiana* (*NbCP*, *NbCP3'*)や、TuMV-NIB3'及びVPg遺伝子を導入した*N.benthamiana* (*NbNIB3'*, *NbVPg*) における

mRNA の検出レベルも形質転換系統により異なっていた。これらの形質転換体における TuMV 抵抗性系統の獲得効率は 5%~35% であり、T₁ 世代における抵抗性個体の次世代からは安定して抵抗性を示す系統が選抜できるものの、多くの形質転換系統は感受性の表現型を示す。AtCP 及び NbCP に導入された遺伝子のコピー数は形質転換系統によって異なっていた。このようなウイルス抵抗性及び感受性表現型の相違は導入遺伝子の種類に関らず、主に RNA サイレンシングによる遺伝子発現抑制レベルが形質転換植物の個体・系統間で異なることが原因であると考えられる。

RNA サイレンシングは植物体内で dsRNA が形成されることにより誘導される (Waterhouse et al., 1998)。アグロバクテリウム法によって形質転換した植物における導入遺伝子の状態は、一般にそのコピー数だけでなく、DNA のメチル化などが起こる場合があり (Bender, 2001)、ゲノム上の挿入部位も不特定であるなど形質転換体ごとに異なる。形質転換植物の自殖後代ではこのような導入遺伝子の状態が固定または分離していく。さらに、逆方向反復配列 (inverted repeat) (Que et al., 1997) の状態などにより RNA サイレンシングを誘導する dsRNA の形成効率が異なる。AtCP の T₂ 世代及び *N. benthamiana* 形質転換体の T₁ 世代では全個体が抵抗性になる系統は認められなかったが、これらの自殖後代からは全ての個体が TuMV 抵抗性を示す系統を選抜することが可能であった。この結果は自殖による導入遺伝子のホモ化やコピー数の増加が RNA サイレンシングを誘導する dsRNA の形成効率を向上させたことによることが推察される。

RNA レベルでのウイルス抵抗性は、一般的には RNA サイレンシングを起こしている導入遺伝子とウイルス遺伝子間における塩基配列の相同性に依存する。Potyvirus の場合、形質転換植物がウイルス抵抗性を示すには導入遺伝子とウイルス遺伝子との間に 90% 以上の相同性が必要と報告されている (Moreno et al., 1998, Xu et al., 2009)。しかし、導入した遺伝子とウイルス遺伝子の相同性が 96% 程度一致していても抵抗性が打破される場合もある (Tennant et al., 1994; Maki-Valkama et al., 2000)。また、導入遺伝子における RNA 分解の対象領域が形質転換系統によって異なる場合がある (English et al., 1996; Sijen et al., 1996, Sonoda et al., 1999, Balmori-Melian et al., 2002)。このような対象領域の違いは、導入遺伝子の状態が形質転換系統によって異なっていることに起因すると考えられる。本研究で AtCP に対する汁液接種試験に用いた TuMV 分離株は CP 遺伝子の相同性以外に病原性の点でも極めて多様な特性を持っているが、供試した TuMV 抵抗性形質転換系統 (TuR-AtCP) はいずれも全ての分離株に対して抵抗性を示し、ウイルス系統に特異的な抵抗性は認められなかった。これは、CP 遺伝子内部にある高い保存性が広範な TuMV 抵抗性に関与していると考えられる。本研究で供試した TuMV では Nib や VPg 遺伝子を導入した場合でも RNA サイレンシングによる TuMV 抵抗性植物を選抜することが出来た。これらの形質転換体については複数の TuMV 分離株を接種し、その反応を調べる試験は行っていない。しかし広範なウイルス系統に対する抵抗性植物を作出するためには対象とするウイルスの遺伝子について塩基配列情報を活用し、保存性が高い領域を含む遺伝子を選択することが重要であり、TuMV に関しては CP 遺伝子を選択することでその効果が期待できると考えられる。

本研究では回復型抵抗性 (リカバリー) 現象を起こす TuMV 抵抗性系統が認められた。形質転換植物に見られるリカバリーは TEV の CP 遺伝子を導入したタバコにおいて、ウイルスの感染により

RNAサイレンシングが誘導される現象として初めて示された (Lindbo et al., 1993)。同様に、Ratcliffら (1997)は自然界の植物に認められるウイルス抵抗性にも RNA サイレンシングの機構が関与していることを証明している。*N. clevelandii*に tomato black ring virus (TBRV) の W22 系統を接種すると、始めは病徴を示すが、後に回復し、回復後の植物は W22 に対する抵抗性反応を示す。しかし W22 系統とは 68%の相同性を示す TBRV の BUK 系統を回復した葉に接種すると抵抗性反応は認められない。このような抵抗性反応は従来から知られているものであるが、これは形質転換植物におけるリカバリーと同一の反応であり、RNA サイレンシングと同様の塩基配列依存的な抵抗性反応が存在することを示している。このように、形質転換植物における RNA サイレンシングと自然界の植物における塩基配列依存型の抵抗性は、ウイルス感染によって誘導される点で共通する場合がある。

2. R 遺伝子による抵抗性と形質転換植物における抵抗性

一般にウイルス抵抗性品種は交配育種により感受性品種に抵抗性遺伝子 (R 遺伝子) を導入する事により作出されるが、本研究で作出した TuR-AtCP に見られるような抵抗性とはウイルス系統に対する特異性が異なる。一般に、R 遺伝子を導入して育成された作物ではウイルス遺伝子の変異によって抵抗性が打破される事例が数多く見られる。例えば、TMV に対する R 遺伝子として、トマトの Tm-1、Tm-2 及び Tm-2²、トウガラシの L 遺伝子などがあり、抵抗性育種に利用されている。しかし、これらの R 遺伝子を打破する TMV 変異体を得られており、TMV 遺伝子の変異によって宿主植物内での増殖が可能になることが明らかにされている (Meshi et al., 1988, 1989; Weber et al., 1993)。また、ピーマンやトウガラシが属するカプシカム属には、PMMoV に対して抵抗性を示す L 遺伝子 (L¹~L⁴) が知られており、抵抗性品種に導入されてきた。しかしこれらの抵抗性遺伝子も完全に PMMoV を防除できるものではなく、これを打破するウイルス系統が全国的に発生している (Tsuda et al., 1998)。穀類では、BaYMV 抵抗性遺伝子を導入したオオムギ品種が複数育成されてきたが、これを侵す系統が発生するようになった。特に、BaYMV 抵抗性遺伝子 *rym5*を持つミサトゴールデンやきぬゆたかなどは導入されるとすぐに BaYMV の III 型による被害を受けるようになった。BaYMV はこれらの抵抗性品種等に対する病原性の違いから I 型~III 型に分類されている (Kashiwazaki et al., 1989)。また、抵抗性遺伝子 *rym3*を持つイシクシラズはこれまでに BaYMV の感染は認められていない品種であったが、香川県などの一部の圃場で縞萎縮症状が認められ、BaYMV とは別種の BaMMV が分離された (Nomura et al., 1996)。イシクシラズなどの BaYMV 抵抗性遺伝子は有効であっても、BaMMV に対して抵抗性は働かないため、これまでに国内で発生が認められていなかった BaMMV が顕在化したことが推察される。このように、交雑育種によって育成された抵抗性品種は特定のウイルス系統に対して感受性であるため、栽培の拡大に伴い、抵抗性を打破するウイルス系統が発生したり、また、対象ウイルスに対する抵抗性は有効であっても別種ウイルスの発生拡大を助長する場合がある。TMV などに見られるように、R 遺伝子による抵抗性が打破される現象に関わるウイルス側の因子については一般にアミノ酸変異を伴うウイルス遺伝子の塩基置換が認められている (Lanfermeijer et al., 2003)。一方、植物ウイルスの遺伝子断片を導入し、RNA サイレンシングを利用したウイルス抵抗性形質転換植物では、対象領域に対し複数の siRNA

がウイルス抵抗性に関与しており、ウイルス遺伝子に突然変異を生じて、それ以外の領域に対する siRNA が機能すると考えられるため、抵抗性打破ウイルスが出現する可能性は極めて低いと推察される。

3. RNAサイレンシング抑制と TuMV 抵抗性打破

PVY と PVX が混合感染した際に見られる相乗作用の解析から、PVY の HC-Pro が PVX の増殖と病徴の激化に関与していることが示されている (Pruss et al 1997)。また、TMV に対する抵抗性遺伝子 Tm-2 を持つトマトに PVX を感染させると TMV に対する抵抗性が打破される (Atabecov and Dorokhov, 1984)。これらの結果は、あるウイルスの感染が、別のウイルスに対する宿主植物の抵抗性反応に影響を与えることを意味している。CMV では本研究で供試した CMV-KT のようなマイルド系統でも RNA サイレンシング抑制能を持ち、宿主植物のウイルス抵抗性に影響を与えることが明らかとなった。一方、本実験で供試した PVY-K1 や PVX-pgR106 ではノーザンブロット解析の結果、RNA サイレンシング抑制能は CMV と同等またはそれ以上であるが、NbCP12R-1 の TuMV 抵抗性は打破しなかった。サプレッサーの機能についてはウイルスごとに解明されており、Potyvirus の HC-Pro、Tombusvirus の P19、Closterovirus の P21 は長さ依存的に ds-siRNA に結合し、RISC 複合体形成を阻害する (Lakatos et al., 2006)。また、Tobamovirus の 126K、Cucumovirus の 2b、Tenuivirus の NS3 なども ds-siRNA に結合する他、2b では RNA サイレンシングシグナルの全身移行や AGO1 結合による RNA 切断活性を阻害することなどが示唆されている (Guo and Ding, 2002; Zhang et al., 2006)。これらのことから NbCP12R-1 の TuMV 抵抗性を打破する能力の違いはウイルスによるサプレッサーの機能の違いによると考えられる。

TuMV の RNA サイレンシングサプレッサーについては、P1/HC-Pro をシロイヌナズナに導入して解析した事例があり、その場合、TuMV が感染した際に見られる病徴と同様の形態異常が起こる (Kasschau et al., 2003)。このように、TuMV のサプレッサーは強力であるにもかかわらず、TuMV 遺伝子を導入した形質転換植物における TuMV 抵抗性を克服できない。しかし導入遺伝子とは別種のウイルスである CMV-KT を 1 次ウイルスとして接種した場合には TuMV 抵抗性は打破されることになり、CMV-KT のサプレッサーが宿主植物の抵抗性反応に大きく関与することを示している。一方、Potyvirus の遺伝子を導入した組換え植物の抵抗性が他の Potyvirus の感染により打破された事例としては、PVA の CP 遺伝子を導入した *N. benthamiana* の PVA 抵抗性が、PVY の感染により抑制されることが報告されており (Savenkov and Valkonen, 2001)、本研究において用いた TuMV 抵抗性形質転換体 (NbCP) と PVY-K1 における試験とは異なる結果となっている。PVY によるウイルス抵抗性打破に関する試験結果の違いは、宿主植物の RNA サイレンシングを抑制する機能が、ウイルスの種類によって異なるだけでなく、同種ウイルスの系統間でも異なることを示唆している。その一例として、Potexvirus の場合、ウイルスによって triple gene block protein1 (TGBp1) の RNA サイレンシング抑制能に違いがあることが報告されている (Senshu et al., 2009)。本研究では CMV-KT は NbCP12R-1 の TuMV 抵抗性を打破し、PVY-K1 や PVX-pGR106 は打破しなかったが、CMV では RNA サイレンシング抑制能が系統によって異なる報告があることから (Goto et al., 2007; Ye et

al., 2009)、ウイルス抵抗性を打破する能力は CMV や PVY、PVX の系統によっても異なることが考えられる。

4. 農業分野における応用の可能性

植物ウイルスによる病害を防除する技術の一つとして、植物ウイルスにおける病原性の強弱とウイルス間の干渉効果を応用した弱毒ウイルスの開発が進められている (Nishiguchi and Kobayashi 2011)。CMV ではこれまでに、様々な弱毒株が分離・作出され、一部のものは実用化されている (本田, 1997; 岩木ら., 1986; 佐山, 2003)。CMV を弱毒化する手法の一つに、病原性を弱める性質を持つ弱毒性のサテライト RNA を、強毒のものと置換したものがある。吉田(1986)は CMV の病徴発現にサテライト RNA が大きく関与することを報告し、病徴を弱める性質を持つ弱毒性のサテライト RNA を用いて CMV 弱毒株を作出した。また、CMV 弱毒株をトマト幼苗に前接種しておくことで、CMV によるトマトモザイク病が予防できることが圃場試験で実証されている (佐山, 2003)。このような場合、2b の配列に違いはないため、病原性は異なっても RNA サイレンシング抑制能は同等であることが推察される。一方、配列の異なる 2b の置換により病原性が異なる CMV を作出することが出来る (Shi et al., 2002, 2003)。このようなキメラウイルスではもとのウイルスとは RNA サイレンシング抑制能が異なる可能性がある。また、Potyvirus でも、HC-Pro に変異を導入することにより病原性の異なるウイルスを作出できる (González et al., 2005)。弱毒ウイルスを実用化するには強毒系統の感染を阻害するだけでなく、宿主植物の抵抗性反応や、他のウイルスの増殖や病徴に影響を与えないことが必要である。ウイルスの病原性とサイレンシング抑制能を調べることは、ウイルス間の相乗作用や宿主の抵抗性反応に影響しない有効な弱毒ウイルスを作出する上でも重要と考えられる。

TuMV が属する Potyvirus や CMV などの Cucumovirus はアブラムシ伝搬性ウイルスであり、これらのウイルスに感受性である露地野菜では各種の防除対策が行われているため、近年では大きな被害は発生していない。しかし、気象変動などの環境要因による病害虫の発生拡大が懸念されており、一部の作物では媒介昆虫の発生拡大により病害発生の北上が顕在化し始めている(村井ら, 2003)。今後、従来は耕種的防除が可能であったウイルス病の発生時期がこれまでよりも拡大する可能性もあり、Potyvirus や Cucumovirus などのアブラムシ伝搬性ウイルスについても抵抗性品種を含めた防除対策の必要性が高まることが考えられる。また、TMV などの土壌伝染性ウイルス病を制御するためには、臭化メチルによる土壌消毒が最も効果的であり、広く普及していたが、2005 年には一部用途を除き先進国では全廃されることが決定された。これに伴い、代替技術の開発が進められているが、土壌伝染性ウイルス病対策は依然として課題になっている。トマトやピーマン等ナス科野菜や、メロン等ウリ科野菜では土壌病害を防ぐために抵抗性台木が使用されている。これらの農作物におけるウイルス抵抗性台木を遺伝子組換え技術により育成することで、効率的な防除が可能になる可能性がある。現在、日本では遺伝子組換え作物に対する抵抗感などの理由から花きなど一部を除いて開放系での商業栽培は見送られている状況であるが、遺伝子組換え体を台木などで間接的に利用する場合は少なくとも穂木の可食部は一般作物と同等であることから比較的受け入れられやすいのではないかと考え

られる。

その他に内生遺伝子を RNA サイレンシングにより抑制することで有用な農作物を作出できる可能性がある。具体的には作物に内在するアレルゲンを抑制することなどが考えられる。食物アレルギーの特定原材料として表示が規定されている作物には小麦、そば、落花生などがあり、これに準ずるものとしてオレンジ等がある。これらの農作物について低アレルゲンのものを従来の交雑育種により作出するには、育種素材を検索し、長期間をかけて交雑と選抜を繰り返す必要がある。農作物に含まれるアレルゲンの発現を抑制することができれば、対象とするタンパク質の機能によっては作物の生育へ影響を及ぼす可能性はあるものの、比較的短期間で低アレルゲン作物を育成することができると考えられる。このような応用技術を実現する上で考慮しなければならないのは植物ウイルスが持つサプレッサーである。特定の遺伝子を発現抑制し、有用な形質を示していたとしても、Potyvirus や CMV などのウイルスが感染した場合にはサプレッサーの働きにより発現抑制されていた遺伝子が発現することになる。したがって、このような作物を実用化する場合には、どのようなウイルスが感染する可能性があるのかを明らかにし、防除対策を立てておくことが必要である。2つの遺伝子を連結して導入することで複数のウイルスに対して抵抗性を持つ植物が得られることが示されており (Jan et al., 2000)、同様の手法により目的とする遺伝子とウイルスの遺伝子を連結して導入するなどして抵抗性個体を選抜しておけば、形質を安定させる上で有効である。また、本研究で対象とした TuMV 抵抗性作物の作出を目的とする場合、混合感染する可能性が高い CMV 遺伝子を連結して導入し、複合抵抗性の個体を選抜することで安定したウイルス抵抗性作物の作出が可能になると考えられる。

有用遺伝子を遺伝子組換えにより実用作物に導入する技術が実用化されて 20 年以上が経過した。この間、アメリカを中心に世界的に急速に普及し、2014 年現在では遺伝子組換え農作物の栽培面積は 1 億 7 千万ヘクタール以上となっている。今後、食糧需要に対する農産物の安定供給とともに、安全な食糧生産及びその効率的な開発はますます重要度を増すと予想される。RNA サイレンシングの誘導には遺伝子組換え体を作成し、目的とする形質を持つ植物を選抜する方法だけでなく、RNA サイレンシングを起こしている台木に接ぎ木し、穂木にサイレンシングを誘導する方法 (Palauqui et al., 1997)、バイナリーベクターに対象遺伝子を組み込み、アグロバクテリウムを介して植物体の一部に感染させ、局所的な遺伝子導入により誘導するアグロインフィルトレーション (Voinnet et al., 1998)、ウイルスベクターに目的とする遺伝子の一部を組み込み、対象植物に感染させる方法 (Ratcliff et al 2001) などがある。これらの技術を目的に応じて有効に活用し、遺伝子機能の解析と農作物の改良がこれまで以上に進展することが期待される。

摘要

ウイルスの外被タンパク質(CP)遺伝子を導入した植物がウイルス抵抗性を示すことがタバコで証明されて以降、同様の手法で実用作物にウイルス抵抗性を付与する試みが世界各地で行われ、一部の作物ではすでに実用化されている。このような遺伝子組換え植物におけるウイルス抵抗性の大部分は RNA mediated resistance であると考えられており、これには RNA の塩基配列特異的な分解機構である RNA サイレンシングが関与していることが明らかになっている。RNA mediated resistance では対象ウイルスに対して高度な抵抗性を示す植物が得られるが、その場合でも抵抗性が系統特異的な場合があり、どの範囲のウイルス系統に対して抵抗性を示すのかが明らかになっていないこと、対象ウイルス以外のウイルス感染などにより抵抗性が打破される場合があることなどの問題点が指摘されている。

ポティウイルス属(以下 Potyvirus) は植物 RNA ウイルスの中で最も大きな科であるポティウイルス科に属し、食糧生産上大きな被害を及ぼすウイルス群の一つである。本研究では Potyvirus を対象とし、日本において抵抗性品種育成と、これを侵すウイルス系統の顕在化による抵抗性の打破が繰り返されてきたオオムギ縞萎縮病について、日本に発生しているオオムギ微斑ウイルス (barley mild mosaic virus, BaMMV) には病原性及び血清関係の異なる少なくとも 2 系統が存在することを明らかにした。次にカブモザイクウイルス (turnip mosaic virus, TuMV) について、シロイヌナズナと *N. benthamiana* を用い、CP 等の TuMV 遺伝子を導入した形質転換体を作成して RNA サイレンシングにより TuMV 抵抗性を示す複数の形質転換系統を得た。また、CP を導入したシロイヌナズナ形質転換体から、病原性や塩基配列の相同性が異なる多数の TuMV に対して抵抗性を示す形質転換系統を選抜できることを明らかにした。さらに、CP を導入した TuMV 抵抗性形質転換体に、神奈川県で分離したキュウリモザイクウイルス (cucumber mosaic virus, CMV) やジャガイモ Y ウイルス (potato virus Y, PVY) の他、ジャガイモ X ウイルス (potato virus X, PVX) など、TuMV とは異なるウイルスが感染した際の TuMV に対する反応について解析を行ない、CMV が TuMV 抵抗性形質転換体に感染した場合に TuMV 抵抗性を打破する可能性があることを明らかにした。これらの結果から、広範な TuMV 抵抗性を持つ作物を作出するためには、混合感染する可能性がある CMV との複合抵抗性を導入した個体を選抜することが有効であると考えられた。

1. 植物ウイルスに見られる病原性の分化

(1) BaMMV における新系統の発生

オオムギ縞萎縮病は *Polymixa graminis* 菌によって土壌伝染するウイルス病であり、日本の他、中国、ヨーロッパなど世界各国で発生し、オオムギに減収や品質低下などの大きな被害を与える重要病害である。オオムギ縞萎縮病の病原としてオオムギ縞萎縮ウイルス (barley yellow mosaic virus, BaYMV) と BaMMV の 2 種が本病に関与することが知られているが、日本では主に BaYMV を対象に抵抗性品種が育成されてきた。1989 年、香川県及び山口県の圃場で BaYMV 抵抗性品種であるイシュクシラズ (*rym3*) 及びきぬゆたか (*rym5*) に縞萎縮病が発生し、BaMMV-Ka1 及び Na1 が

分離された。本研究ではこれらの BaMMV が、ドイツで分離された既知系統である BaMMV-M とは病原性及び血清型の異なる新系統であることを明らかにした。

(2) 神奈川県で分離した TuMV の病原性

神奈川県平塚市内で栽培されているダイコン及びキャベツのモザイク症状株から TuMV-KR 株及び KC 株をそれぞれ分離し、これらの病原性について、TuMV ナタネ分離株 (TuMV-JO) と比較した。汁液接種試験では JO、KR 及び KC の病原性の違いはダイコン及びキャベツにおいてのみ認められ、JO 及び KR はいずれもダイコンに感染したが、KC は感染しなかった。一方、KC はキャベツには全身感染したが、JO 及び KR は感染しなかった。次に TuMV-JO 抗体を用いて分離株間の CP をウエスタンブロット法により検出したところ、3 分離株とも TuMV-JO 抗体に明確な反応を示すとともに、CP のサイズにも差は認められなかった。

2. TuMV ゲノム由来の遺伝子を導入した形質転換植物の作出と TuMV 抵抗性

TuMV-JO の CP 遺伝子全長(864bp)を導入したシロイヌナズナ形質転換体 (*AtCP*) を作出し、TuMV に対する反応を調べた。その結果、*AtCP* では T₂ 世代の 23 系統中 4 系統で半数以上の個体が高度な抵抗性を示し、これらの後代から全ての個体が抵抗性になる系統 (*AtCP112-R1*, *AtCP202-R1*, *AtCP232-R1*) (以下 TuR-*AtCP*) が得られた。また、TuMV-CP の他、CP の 3'末端側部分塩基配列 (430bp)、NIb の 3'末端側部分塩基配列 (820bp) 及びゲノム結合タンパク質 (VPg) 遺伝子全長(575bp)を *Nicotiana benthamiana* に導入した形質転換系統(*NbCP*, *NbCP3'*, *NbNIb3'*及び *NbVPg*)を作出して TuMV 抵抗性を検定した。*N. benthamiana* では導入遺伝子の種類に関らず、高度な抵抗性を示す個体、及び TuMV を接種した後に展開してくる葉には病徴が見られるが、その後展開する葉には病徴が認められなくなる回復型抵抗性 (リカバリー) 示す個体が認められた。抵抗性系統の T₁ 世代では抵抗性と感受性が分離したが、T₂ 世代の選抜により全ての個体が抵抗性となる系統が得られた。シロイヌナズナ形質転換体 (*AtCP*) のサザンブロット解析では、TuMV 抵抗性系統における導入遺伝子のコピー数は 2~4、感受性系統では 2~7 コピーであると推定された。また、*N. benthamiana* 形質転換体 (*NbCP*) のサザンブロット解析では、抵抗性系統は 2~4 コピー、感受性系統は 1~2 コピーと推定された。ノーザンブロット解析では、*AtCP* の感受性系統からは CP の mRNA 及び CP が検出されたのに対し、抵抗性系統ではいずれも検出されなかった。*NbCP* では導入遺伝子の mRNA 検出レベルは、感受性系統ではそのほとんどで検出されるのに対し、抵抗性系統では極めて低いか、または検出されなかった。さらに *AtCP* 及び *NbCP* の TuMV 抵抗性またはリカバリーを示した個体からは siRNA が検出され、*AtCP* 及び *NbCP* における TuMV 抵抗性は RNA サイレンシングによるものであることが明らかとなった。さらに、TuR-*AtCP* に病原性及び CP 配列の相同性が異なる 20 種類の TuMV 分離株を接種した結果、供試した TuMV 分離株に対し、すべての系統が抵抗性を示した。これらの結果から、TuMV-CP の導入によりアブラナ科及びナス科などの異種植物で抵抗性植物を作出できること、また、広範な TuMV に対して有効であることが示された。

3. TuMV 抵抗性形質転換体の CMV 感染による抵抗性打破

神奈川県で分離された CMV トマト分離株 (CMV-KT) を用い、RNA サイレンシング抑制と TuMV 抵抗性に対する影響について調べた。CMV-KT は *N. benthamiana* やシロイヌナズナなどのモデル植物に全身感染したが、その病原性は極弱かった。CMV-KT からはサテライト RNA は検出されず、また CP 遺伝子の相同性からサブグループ II に属するマイルド系統と考えられた。CMV-KT の RNA サイレンシング抑制能を調べるため、TuR-AtCP に CMV-KT を接種し、TuMV の CP 遺伝子の発現復帰レベルを指標に RNA サイレンシング抑制能を調べた。ポジティブコントロールとしてサブグループ I に属し、病原性の強い CMV-Y を用いた。CMV-KT に感染した TuR-AtCP では、接種後に展開してくる葉で TuMV-CP の発現が確認され、その発現レベルは CMV-Y よりもやや高かった。このことから CMV-KT は、病原性は弱いものの、高い RNA サイレンシング抑制能を有する可能性が示唆された。

次に、RSS の機能が解析されている主要なウイルスである CMV、PVY、及び PVX が感染した際に見られる RNA サイレンシングの抑制と、これらのウイルスが TuMV 抵抗性形質転換体における TuMV 抵抗性を打破する可能性について調べた。TuMV 抵抗性形質転換体として TuR-AtCP 及び NbCP のサイレンシング系統 (NbCP12-R1) を用いた。TuR-AtCP には CMV-KT を、また、NbCP12-R1 には CMV-KT、PVX-pgR106 または PVY-K1 の各ウイルスをそれぞれ 1 次ウイルスとして前接種した後、2 次ウイルスとして TuR-AtCP では TuMV-JO を、また NbCP12-R1 には感染した植物から GFP 蛍光を検出できる TuMV-GFP を接種した。2 次ウイルス接種後に病徴を観察するとともに 2 次ウイルスの感染を RT-PCR または GFP 蛍光を観察することで検定した。TuR-AtCP に CMV-KT を接種後の展開葉に TuMV を接種した植物の中に病徴を示す個体が確認され、TuMV が検出されたことから、TuR-AtCP の TuMV 抵抗性が CMV-KT により打破されていることが確認された。NbCP12-R1 でも同様の現象が認められ、CMV-KT 接種後の展開葉に TuMV-GFP を接種した植物の中に病徴を示す個体が確認され、これらの個体では感受性植物とは異なるスポット状の GFP 蛍光が観察された。PVY-K1 及び PVX-pGR106 を 1 次接種した後に TuMV を 2 次接種した場合は 1 次接種後の日数に係わらず TuMV は感染せず、TuMV 抵抗性は維持されていた。CMV、PVX 及び PVY を接種後のノーザンブロットではいずれのウイルスに感染した場合でも導入遺伝子 (TuMV-CP) 由来の mRNA の蓄積が認められ、その蓄積レベルはウイルスにより異なり、最も蓄積レベルが高いのは PVY-K1 に感染した植物であり、次いで CMV-KT、PVX-pGR106 の順であった。CMV 間で比較すると、病原性が強い CMV-Y よりも CMV-KT の方が CP-mRNA 蓄積レベルがやや高かった。よって、ウイルス間または CMV 系統間でサイレンシング抑制レベルが異なっていた。また、CMV-KT、PVX-pGR106 及び PVY-K1 感染後の NbCP12-R1 から TuMV-CP の siRNA を検出したところ、CMV-KT で最も蓄積レベルが低く、次いで PVY-K1 であり、PVX-pGR106 が最も高かった。これらの結果から、いずれのウイルスに感染した植物においても RNA サイレンシングが完全には解除されず、導入遺伝子由来する mRNA の分解反応はある程度維持されていると考えられた。したがって、CMV-KT 感染後に見られる TuMV 抵抗性打破は、導入遺伝子から形成される dsRNA の分解後に標的となるウイルス RNA との結合などの抵抗性反応に関与する過程が、CMV-KT の感

染により部分的に阻害されていることが推察された。

以上、本研究において TuMV-CP 遺伝子等を導入したシロイヌナズナ及び *N.benthamiana* からいずれも RNA サイレンシング機構により広範な TuMV 系統に対する抵抗性植物が得られることを明らかにした。一方、マイルド系統の CMV-KT が形質転換植物における TuMV 抵抗性を打破する性質があることを明らかにした。遺伝子組換え技術を利用してウイルス抵抗性作物を作出する場合、混合感染する可能性が高い CMV などの遺伝子を連結して導入し、複合抵抗性の個体を選抜することにより安定したウイルス抵抗性作物の作出が可能になると考えられる。

謝辞

東京大学大学院農学生命科学研究科生産・環境生物学専攻・植物病理学研究室教授 難波成任博士には本論文作成の機会を与えていただくとともに多大なるご指導を賜った。神奈川県農業技術センター所長 北 宜裕博士、同生産環境研究部長 植草秀敏博士には終始ご指導、ご助言をいただいた。ここに謹んで甚深なる感謝の意を表す。

本研究を遂行するための実験手法と技術の多くは旧農林水産省農業研究センターウイルス病防除研究室において、故柏崎 哲博士からご教授いただいた。また、同研究室において公私にわたってご指導いただいた日比野啓行博士、大村敏博博士並びに石川浩一博士に深く感謝の意を表す。

茨城大学農学部植物生体防御学研究室教授 阿久津克己博士には多くのご指導をいただいた。また、佐賀大学農学部植物ウイルス病制御学研究室教授 大島一里博士、宇都宮大学農学部植物病理学研究室教授 夏秋知英博士、東北大学大学院農学研究科植物病理学分野教授 高橋英樹博士には貴重なウイルス分離株を分譲していただくとともにご助言をいただいた。本研究の多くは神奈川県農業技術センター生物資源部及び野菜作物研究部在席時に実施したものであり、関係各位には様々なご指導とご協力をいただいた。また、農芸技能員の仲田喜代子氏、小笠原光子氏、高橋洋子氏には本研究を遂行するにあたり、多くのご協力をいただいた。ここに記して感謝の意を表す。

引用文献

- Adams, M. J., Swaby, A. G., and Jones, P. 1987. Occurrence of two strains of barley yellow mosaic virus in England. *Plant Pathol* 36:610-612.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G. J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A. C., Smith, T. H., and Vance, V. B. 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13079-13084.
- 青野信男 1968. キュウリおよびプリンスメロンにおけるウイルス病の発生消長と病原ウイルスの種類. 神奈川園研報 第16号:72-78.
- Atabekov, J. G., and Dorokhov, Y. L. 1984. Plant virus-specific transport function and resistance of plant to viruses. *Adv. Virus Res* 29:313-364.
- Audy, P., Palukaitis, P., Slack, S. A., and Zaitlin, M. 1994. Replicase-mediated resistance to potato virus Y in transgenic tobacco plants. *Mol. Plant-Microbe Interact* 7:15-22.
- Balmori-Melian, E., MacDiarmid, R. M., Beck, D. L., Gardner, R. C., and Forster, R. L. S. 2002. Sequence-, tissue-, and delivery-specific targeting of RNA during post-transcriptional gene silencing. *Mol. Plant-Microbe Interact* 15:753-763.
- Bartel D. P. 2004. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297.
- Bau, H. J., Cheng, Y. H., Yu, T. A., Yang, J. S., and Yeh, S. D. 2003. Broad-spectrum resistance to different geographic strains of *Papaya ringspot virus* in coat protein gene transgenic papaya. *Phytopathology* 93:112-120.
- Baulcombe, D. C. 1996. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* 8:1833-1844.
- Baulcombe, D. C. 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431:356-363.
- Baulcombe, D. C. 2005. RNA silencing. *Trends in Biochemical Sciences* 30:290-293.
- Bazzini, A. A., Hopp, H. E., Beachy, R. N., and Asurmendi, S. 2006. Posttranscriptional gene silencing does not play a significant role in potato virus X coat protein-mediated resistance. *Phytopathology* 96:1175-1178.
- Beachy, R. N. 1997. Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Curr. Opin. Biotechnol* 8:215-220.
- Bechtold, N., Ellis, J., and Pelletier, G. 1993. *In planta* Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci* 316:1194-1199.
- Beck, D. L., van Dolleweerd, C. J., Lough, T. J., Balmori, E., Voot, D. M., Andersen, M. T., O'Brien, I. E. W., and Forster, R. L. S. 1994. Disruption of virus movement confers broad-spectrum resistance against systemic infection by plant viruses with a triple gene block. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10310-10314.
- Béclin, C., Berthomé, R., Palauqui, J., Tepfer, M., and Vaucheret, H. 1998. Infection of tobacco or Arabidopsis plants by CMV counteracts systemic post-transcriptional silencing of nonviral (trans) genes. *Virology* 252:313-317.

- Bender, J. 2001. A vicious cycle: RNA silencing and DNA methylation in plants. *Cell* 106:129-132.
- Billy, E., Brondani, V., Zhang, H. D., Muller, U., and Filipowicz, W. 2001. Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:14428-14433.
- Berzal-Herranz, A., De La Cruz, A., Tenllado, F., Diaz-Ruiz, J. R., Lopez, L., Sanz, A. I., Vaquero, C., Serra, M. T., and Garcia-Luque, I. 1995. The *Capsicum L3* gene-mediated resistance against the tobamoviruses is elicited by the coat protein. *Virology* 209:498-505.
- Brandes, J., and Bercks, R. 1965. Morphology and seology as a basis for classification of elongated plant viruses. *Adv. Virus Res* 11:1-24.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W. X., Ji, L. H., Ding, S. W., and Baulcombe, D. C. 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J* 17:6739-6746.
- Carr, J. P., Marsh, L. E., Lomonosoff, G. P., Sekiya, M. E., and Zaitlin, M. 1992. Resistance to tobacco mosaic virus induced by the 54-kDa gene sequence requires expression of the 54-kDa protein. *Mol. Plant-Microbe Interact* 5:397-404.
- Carrington, J. C., Kasschau, K. D., and Johansen, L. K. 2001. Activation and suppression of RNA silencing by plant viruses. *Virology* 281:1-5.
- Chang, C., Bowman, J. L., De John, A. W., Lander, E. S., and Meyerowitz, E. M. 1988. Restriction fragments length polymorphism linkage map for *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6856-6860.
- Chen, B., and Francki, R. I. B. 1990. Cucumovirus transmission by the aphid *Myzus persicae* is determined solely by the viral coat protein. *J. Gen. Virol* 71:939-944.
- 近岡一郎・矢吹俊一・阿久津四郎・宇田川晃・竹沢秀夫 1981. ダイコンモザイク病と防除に関する調査研究. *神奈川農総研報* 122: 33-46.
- Choi, J. K., Maeda, T., and Wakimoto, S. 1977. An improved method for purification of turnip mosaic virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 43:440-448.
- Clark, M. F., and Adams, A. N. 1977. Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-483.
- Cogoni, C., and Macino, G. 1997. Isolation of quelling-defective (*qde*) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10233-10238.
- Cooper, B., Lapidot, M., Heick, J. A., Dodds, J. A., and Beachy, R. N. 1995. A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility. *Virology* 206:307-313
- Devic M., Jaegle, M., and Baulcombe, D. C. 1989. Symptom production on tobacco and tomato is determined by two distinct domains of the satellite RNA of cucumber mosaic virus (strain Y). *J. Gen. Virol* 70:2765-2774.

- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., and Helinski, D. R. 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7347-7351.
- Ding, S. W., Anderson, B. J., Haase, H. R., and Symons, R. H. 1994. New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome. Virology 198:593-601.
- Ding, S. W., Li, W. X., and Symons, R. H. 1995. A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. EMBO J 14:5762-5772.
- Ding, S. W. 2000. RNA silencing. Current Opinion in Biotechnology 11:152-156.
- Dougherty, W. G., Lindbo, J. A., Smith, H. A., Parks, T. D., Swaney, S., and Proebsting, W. M. 1994. RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. Mol. Plant-Microbe Interact 7:544-552.
- Dougherty, W. G., and Parks, T. D. 1995. Transgenes and gene suppression: telling us something new? Current Opinion in Cell Biology 7:399-405.
- Dougherty, W. G., and Carrington, J. C. 1988. Expression and function of potyviral gene products. Annu. Rev. Phytopathol 6:123-143.
- Duan, C. G., Fang, Y. Y., Zhou, B. J., Zhao, J. H., Hou, W. N., Zhu, H., Ding, S. W., and Guo, H. S. 2012. Suppression of *Arabidopsis* ARGONAUTE1-mediated slicing, transgene-induced RNA silencing, and DNA methylation by distinct domains of the *Cucumber mosaic virus* 2b protein. Plant Cell 24:259-274.
- Dunoyer, P., Lecellier, C. H., Parizotto, E. A., Himber, C., and Voinnet, O. 2004. Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. Plant Cell 16:1235-1250.
- Dunoyer, P., Schott, G., Himber, C., Meyer, D., Takeda, A., Carrington, J. C., and Voinnet, O. 2010. Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. Science 328:912-916.
- Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T. 2001. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. EMBO J 20:6877-6888.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 411:494-498.
- English, J. J., Mueller, E., and Baulcombe, D. C. 1996. Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. Plant Cell 8:179-188.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. A., and Mello, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391:806-811.
- Fuchs, M., and Gonsalves, D. 2008. Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: lessons from realistic field risk assessment studies. Annu. Rev.

Phytopathol 45: 173-202.

Fuchs, M., McFerson, J. R., Tricoli, D. M., McMaster, J. R., Deng, R. Z., Boeshore, M. L., Reynolds, J. F., Russell, P. F., Quemada, H. D. and Gonsalves, D. 1997. Cantaloupe line CZW-30 containing coat protein genes of cucumber mosaic virus, zucchini yellow mosaic virus, and watermelon mosaic virus-2 is resistant to these three viruses in the field. *Molecular Breeding* 3:279-290.

Germundsson, A., Sandgren, M., Barker, H., Savenkov, E. I., and Valkonen, J. P. T. 2002. Initial infection of roots and leaves reveals different resistance phenotypes associated with coat protein gene-mediated resistance to potato mop-top virus. *J. Gen. Virol* 83:1201-1209.

Germundsson, A., and Valkonen, J. P. T. 2006. P1- and VPg-transgenic plants show similar resistance to Potato virus A and may compromise long distance movement of the virus in plant sections expressing RNA silencing-based resistance. *Virus Res.* 116:208-213.

Gonsalves, D., Provvidenti, R., and Edwards, M. C. 1982. Tomato white leaf: the relation of an apparent satellite RNA and cucumber mosaic virus. *Phytopathology* 72:1533-1538.

González, I., Martínez, L., Rakitina, D. V., Lewsey, M. G., Atencio, F. A., Llave, C., Kalinina, N. O., Carr, J. P., Palukaitis, P., and Canto, T. 2010. *Cucumber mosaic virus* 2b protein subcellular targets and interactions: Their significance to RNA silencing suppressor activity. *Mol. Plant-Microbe Interact* 23:294-303.

González-Jara, P., Atencio, F. A., Martínez-García, B., Barajas, D., Tenllado, F., and Díaz-Ruiz, J. R. 2005. A single amino acid mutation in the plum pox virus helper component-proteinase gene abolishes both synergistic and RNA silencing suppression activities. *Phytopathology* 95:894-901.

Goodwin, J., Chapman, K., Swaney, S., Parks, T. D., Wernsman, E. A., and Dougherty, W. G. 1996. Genetic and biochemical dissection of transgenic RNA-mediated virus resistance. *Plant Cell* 8:95-105.

Goto, K., Kobori, T., Kosaka, Y., Natsuaki, T., and Masuta, C. 2007. Characterization of silencing suppressor 2b of *Cucumber mosaic virus* based on examination of its small RNA-binding abilities. *Plant Cell Physiol* 48:1050-1060.

Götz, R., Ordon, F., and Friedt, W. 1991. Resistance to the 'barley yellow mosaic virus complex' and genetic diversity of BaMMV-resistance. In *Barley Genetics VI. Proc. 6th. Int Barley Genet Symp. Helsinki*. pp. 610-614.

Grieco, F., La Nave, C., and Gallitelli, D. 1997. Evolutionary dynamics of cucumber mosaic virus satellite RNA during natural epidemics in Italy. *Virology* 229:166-174.

Grierson D., Fray R. G., Hamilton A. J., Smith C. J. S., and Watson C. F. 1991. Does co-suppression of sense genes in transgenic plants involve antisense RNA? *Trends Biotechnol* 9:122-123.

Guo, H. S., and Ding, S. W. 2002. A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO J* 21:398-407.

Hamilton, A. J., and Baulcombe, D. C. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286:950-952.

- Hannon, G. J. 2002. RNA interference. *Nature* 418:244-251.
- Hirata, H., Lu, X., Yamaji, Y., Kagiwada, S., Ugaki, M., and Namba, S. 2003. A single silent substitution in the genome of Apple stem grooving virus causes symptom attenuation. *J. Gen. Virol* 84:2579-2583.
- Hollings, M., and Brunt, A. A. 1981. Potyviruses. In *Handbook of plant virus infections: comparative diagnosis* (E. Kurstak, ed.). pp731-807. Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- 本田要八郎 1997. 弱毒ウイルスによるウイルス病防除. *農業技術* 52:447-449.
- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffman, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G., and Fraley, R. T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231.
- Huth, W. and Adams, M. J. 1990. Barley yellow mosaic virus (BaYMV) and BaYMV-M: two different viruses. *Intervirology* 31:38-42.
- Huth, W., Lesemann, D.-E., and Paul, H.-L. 1984. Barley yellow mosaic virus: purification, electron microscopy, serology, and other properties of two types of the virus. *Phytopath. Z* 111:37-54.
- 岩田吉人・石崎 寛・野田弘之・横川龍鳳 1956. カラシナのモザイク病に就いて. *三重大農学術報* 10:19-27.
- 岩木満朗・善林六朗・花田 薫・渋川三郎・栃原比呂志 1986. キュウリモザイクウイルス(CMV)の弱毒系統を用いた CMV によるトマトモザイク病の防除. *日植病報* 52:745-751.
- Jan, F-J., Pang, S-Z., Fagoaga, C., and Gonsalves, D. 1999. Turnip mosaic potyvirus resistance in *Nicotiana benthamiana* derived by post-transcriptional gene silencing. *Transgenic Res* 8:203-213.
- Jan, F-J., Fagoaga, C., Pang, S-Z., and Gonsalves, D. 2000. A single chimeric transgene derived from two distinct viruses confers multi-virus resistance in transgenic plants through homology-dependent gene silencing. *J. Gen. Virol* 81:2103-2109.
- Jenner, C. E., Tomimura, K., Ohshima, K., Hughes, S. L., and Walsh, J. A. 2002. Mutations in *Turnip mosaic virus* P3 and cylindrical inclusion proteins are separately required to overcome two *Brassica napus* resistance genes. *Virology* 300:50-59.
- Jenner, C., Wang, X., Tomimura, K., Ohshima, K., Ponz, F., and Walsh, J. A. 2003. The dual role of the potyvirus P3 protein of turnip mosaic virus as a symptom and avirulence determinant in Brassicas. *Mol. Plant-Microbe Interact* 16:777-784.
- Jianping, C., Adams, M. J., Fengtai, Z., Chen, S., and He, C. 1992. Responses of some Asian and European barley cultivars to UK and Chinese isolates of soil-borne barley mosaic viruses. *Ann. Appl. Biol* 121:631-639.
- Jones, A. L., Johansen, I. E., Bean, S. J., Bach, I., and Maule, A. J. 1998. Specificity of resistance to pea seed-borne mosaic potyvirus in transgenic peas expressing the viral replicase (NIb) gene. *J. Gen. Virol* 79:3129-3137.
- Jorgensen, R. A., Cluster, P. D., English, J., Que, Q., and Napoli, C. A. 1996. Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: Comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Mol. Biol* 31:957-973.

- Kaneko, Y., Natsuaki, T., Bang, S. B., and Matsuzawa, Y. 1996. Identification and evaluation of turnip mosaic virus (TuMV) resistance gene in kale monosomic addition lines of radish. *Breeding Science* 46:117-124.
- Kasschau, K. D., and Carrington, J. C. 1998. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of post-transcriptional gene silencing. *Cell* 95:461-470.
- Kasschau, K. D., Xie, Z. X., Allen, E., Llave, C., Chapman, E. J., Krizan, K. A., and Carrington, J. C. 2003. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev. Cell* 4:205-217.
- Kashiwazaki, S., Ogawa, K., Usugi, T., Ogawa, T., and Tsuchizaki, T. 1989. Characterization of several strains of barley yellow mosaic virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 55:16-25.
- Kashiwazaki, S., Minobe, Y., Omura, T. and Hibino, H. 1990. Nucleotide sequence of barley yellow mosaic virus RNA 1: a close evolutionary relationship with potyviruses. *J. Gen. Virol* 71:2781-2790.
- Kashiwazaki, S., Nomura, K., Kuroda, H., Ito, K., Hibino, H. 1992. Sequence analysis of the 3' -terminal halves of RNA 1 of two strains of barley mild mosaic virus. *J. Gen. Virol* 73: 2173-2181.
- Konishi, T., and Kaiser, R. 1991. Genetic difference in barley yellow mosaic virus resistance between Mokusekko 3 and Misato Golden. *Japan J. Breed* 41:499-505.
- Konishi, T. 2000. Proposed gene symbols for resistance to Barley Mild Mosaic Virus (BaMMV) in barley. *Barley Genet. Newsletter* 30:4-5.
- Konishi, T., F. Ordon and M. Furusho 2002. Reactions of barley accessions carrying different rym genes to BaYMV and BaMMV. *Barley Genet. Newsletter* 32:46-48.
- Kubota, K., Tsuda, S., Tamai, A., and Meshi, T. 2003. Tomato mosaic virus replication protein suppresses virus-targeted posttranscriptional gene silencing. *J. Virol* 77:11016-11026.
- Kumagai, M. H., Donson, J., Della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K., and Grille, L. K. 1995. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1679-1683.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* 227:680-685.
- Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E. J., Carrington, J. C., Liu, Y-P., Dolja, V. V., Calvino, L. F., Lopez-Moya, J. J., and Burgyn, J. 2006. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J* 25:2768-2780.
- Lanfermeijer, F. C., Dijkhuis, J., Sturre, M. J., de Haan, P., and Hille, J. 2003. Cloning and characterization of the durable tomato mosaic virus resistance gene Tm-2² from *Lycopersicon esculentum*. *Plant Mol. Biol* 52:1037-1049.
- Lawson, C., Kaniewski, W., Haley, L., Rozman, R., Newell, C., Sanders, P., and Tumer, N. E. 1990. Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank. *Bio/Tech*

8:127-134.

Lewsey, M., Robertson, F. C., Canto, T., Palukaitis, P., Carr, J. P. 2007. Selective targeting of miRNA-regulated plant development by a viral counter-silencing protein. *Plant J.* 50:240–252.

Lewsey, M., Surette, M., Robertson, F. C., Ziebell, H., Choi, S. H., Ryu, K. H., Canto, T., Palukaitis, P., Payne, T., Walsh, J. A., and Carr, J. P. 2009. The role of *Cucumber mosaic virus* 2b protein in viral movement and symptom induction. *Mol. Plant-Microbe Interact* 22:642-654.

Lin S-S, Wu H-W, Jan F-J, Hou RF, Yeh S-D. 2007. Modifications of the helper component-protease of Zucchini yellow mosaic virus for generation of attenuated mutants for cross protection against severe infection. *Phytopathology* 97:287–296

Lindbo, J. A., and Dougherty, W. G. 1992. Untranslatable transcripts of the Tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with Tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* 189:725-733.

Lindbo, J. A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W. M., and Dougherty, W. G. 1993. Induction of highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 5:1749-1759.

Lindbo, J. A., and Dougherty, W. G. 2005. Plant pathology and RNAi: a brief history. *Annu. Rev. Phytopathol* 43:191-204.

Lomonosoff, G. P. 1995. Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol* 33:323-343.

Maki-Valkama, T., Valkonen, J. P. T., Kreuze, J. F., and Pehu, E. 2000. Transgenic resistance to PVY⁰ associated with post-transcriptional silencing of P1 transgene is overcome by PVY^N strains that carry highly homologous P1 sequences and recover transgene expression at infection. *Mol. Plant-Microbe Interact* 13:366-373.

Marathe, R., Anandalakshmi, R., Smith, T., Pruss, G., and Vance, V. 2000. RNA viruses as inducers, suppressors and targets of post-transcriptional gene silencing. *Plant Mol. Biol* 43:295-306

Martin, A.M., Cabreray Poch, H. L., Martinez-Herrera, D., and Ponz, F. 1999. Resistance to turnip mosaic potyvirus in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact* 12:1016-1021.

Mallory, A., Ely, L., Smith, T., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L., and Vance, V. 2001. HC-pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell* 13:571-583

Mascia, T., Cillo, F., Fanelli, V., Finetti-Sialer, M. M., De Stradis, A., Palukaitis, P., and Gallitelli, D. 2010. Characterization of the interactions between *Cucumber mosaic virus* and *Potato virus Y* in mixed infections in tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact* 23: 1514-1524.

Meister G., and Tuschl T. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431:343-349.

Meshi, T., Motoyoshi, F., Adachi, A., Watanabe, Y., Takamatsu, N., and Okada, Y. 1988. Two concomitant base substitutions in the putative replicase genes of tobacco mosaic virus confer

the ability to overcome the effect of a tomato resistance gene Tm-1. *EMBO J* 7:1575-1581.

Meshi, T., Motoyoshi, F., Maeda, T., Yoshioka, S., Watanabe, H., and Okada, Y. 1989. Mutations in the tobacco mosaic virus 30-kD protein gene overcome Tm-2 resistance in tomato. *Plant Cell* 1:515-522.

Mitter, M., Sulistyowati, E., and Dietzgen, R. G. 2003. Cucumber mosaic virus infection transiently breaks dsRNA-induced transgenic immunity to potato virus Y in tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact* 16:936-944.

Mlnar, A., Melnyk, C. W., Bassett, A., Hardcastle, T. J., Dunn, R., and Baulcombe, D. C. 2010. Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* 328:872-75.

Mol, J., van Blokland, R., and Kooter, J. 1991. More about cosuppression. *Trends Biotechnol* 9:182-183.

Moreno, M., Bernal, J. J., Jimenez, I., and Rodriguez-Cerezo, E. 1998. Resistance in plants transformed with the P1 or P3 gene of tobacco vein mottling potyvirus. *J. Gen. Virol* 79:2819-2827.

Mueller, E., Gilbert, J., Davenport, G., Brigneti, G., and Baulcombe, D. C. 1995. Homology-dependent resistance: transgenic virus resistance in plants related to homology-dependent gene silencing. *Plant J* 7:1001-1013.

Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.

村井 保・今井 準・吉田幸二・足立 礎・新井朋徳・刑部正博 2003. 病害虫の発生に及ぼす気候温暖化の影響. 平成 15 年度果樹農業生産構造に関する報告書 2.3. (独)農研機構果樹研究所.

Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous gene in trans. *Plant Cell* 2: 279-289

駒松市朗兵衛・白浜賢一・本橋精一 1953. 大根モザイク病に関する研究. *東京農試研報* 1:1-20.

Nicolas, O., and Laliberte, J. F. 1992. The complete nucleotide sequence of turnip mosaic potyvirus RNA. *J. Gen. Virol* 73:2785-2793.

Nishiguchi, M., and Kobayashi, K. 2011. Attenuated plant viruses: preventing virus diseases and understanding the molecular mechanism. *J. Gen. Plant. Pathol* 77: 221-229.

野村 研・柏崎 哲・中田 栄一郎・都崎 芳久・日比野 啓行・奥山 哲 1992. オオムギマイルドモザイクウイルスの発生. *関東病虫研報* 39:33-35.

野村 研・植草秀敏・北 宜裕 2007. 神奈川県で分離したカブモザイクウイルス(TuMV)の特性. *神奈川農技セ研報* 149:1-6.

Nomura, K., Kashiwazaki, S., Hibino, H., Inoue, T., Nakata, E., Tsuzaki, Y., and Okuyama, S. 1996. Biological and serological properties of strains of barley mild mosaic virus. *J. Phytopathol* 144:103-107.

Nomura, K., Ohshima, K., Anai, T., Uekusa, H., and Kita, N. 2004. RNA-silencing of the

introduced coat protein gene of *Turnip mosaic virus* confers the broad spectrum resistance in transgenic *Arabidopsis*. *Phytopathology* 94:730-736.

野村 研・植草秀敏・北 宜裕 2012. 神奈川県のとまとから分離したキュウリモザイクウイルスの特性. 関東病虫研報 59:43-45.

野村 研・植草秀敏・北 宜裕 2013.カブモザイクウイルス(TuMV)ゲノム由来の遺伝子を導入した *Nicotiana benthamiana*における TuMV 抵抗性. 神奈川農技セ研報 155:1-10.

Nomura, K., Uekusa, H., and Kita, N. 2014. Suppression of transgene RNA silencing in transgenic *Arabidopsis thaliana* by a mild strain of *Cucumber mosaic virus*. *J. Gen. Plant. Pathol* 80: 443-448.

Okano, Y., Senshu, H., Hashimoto, M., Neriya, Y., Netsu, O., Minato, N., Yoshida, T., Maejima, K., Oshima, K., Komatsu, K., Yamaji, Y., and Namba S. 2014. In planta recognition of a double-stranded RNA synthesis protein complex by a potexviral RNA silencing suppressor. *The Plant Cell* 26: 2168-2183.

Ohshima, K., Tanaka, M., and Sako, N. 1996. The complete nucleotide sequence of turnip mosaic virus RNA Japanese strain. *Arch. Virol* 141:1991-1997.

Ohshima, K., Yamaguchi, Y., Hirota, R., Hamamoto, T., Tomimura, K., Tan, Z., Sano, T., Azuhata, F., Walsh, J. A., Fletcher, J., Chen, J., Gera, A., and Gibbs, A. 2002. Molecular evolution of *Turnip mosaic virus*: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *J. Gen. Virol* 83:1511-1521.

大島一里 2012. 植物感染性ポテivirusの進化；集団遺伝構造の変化. *ウイルス* 62:151-160

Palauqui, J-C., Elmayan, T., Pollien, J-M., and Vaucheret, H. 1997. Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J* 16:4738-4745.

Palukaitis, P., Roossinck, M., Dietzgen, R. G., and Francki, R. I. B. 1992. Cucumber mosaic virus. *Adv. Virus Res* 41:281-348.

Palukaitis, P., and Zaitlin, M. 1997. Replicase-mediated resistance to plant virus disease. *Adv. Virus Res* 48:349-377.

Pang, S-Z., Jan, F-J., Carney, K., Stout, J., Tricoli, D. M., Quemada, H. D., and Gonsalves, D. 1996. Post-transcriptional transgene silencing and consequent tospovirus resistance in transgenic lettuce are affected by transgene dosage and plant development. *Plant J* 9:899-909.

Pang, S-Z., Jan, F-J., and Gonsalves, D. 1997. Nontarget DNA sequences reduce the transgene length necessary for RNA-mediated tospovirus resistance in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:8261-8266.

Powell, A. P., Nelson, R. S., De, B., Hoffman, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T., and Beachy, R. N. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232:738-743.

Powell, P. A., Sanders, P. R., Tumer, N., Fraley, R. T., and Beachy, R. N. 1990. Protection against tobacco mosaic virus infection in transgenic plants requires accumulation of coat protein rather than coat protein RNA sequences. *Virology* 175:124-130.

Prins, M., Laimer, M., Noris, E., Schubert, J., Wassenegger, M., Tepfer, M. 2008. Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Mol. Plant. Pathol* 9:73-83.

Provvidenti, R. 1980. Evaluation of Chinese cabbage cultivars from Japan and the People's Republic of China for resistance to turnip mosaic virus and cauliflower mosaic virus. *J. Am. Soc. Hortic. Sci* 105:571-573.

Pruss, G., Ge, X., Shi, X. M., Carrington, J., and Vance, V. B. 1997. Plant viral synergism: The potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous virus. *Plant Cell* 9:859-868.

Que, Q., Wang, H-Y., English, J., and Jorgensen, R. A. 1997. The frequency and degree of cosuppression by sense chalcone synthase transgenes are dependent on transgene promoter strength and are reduced by premature nonsense codons in the transgene coding sequence. *Plant Cell* 9:1357-1368.

Ratcliff, F., Harrison, B. D., and Baulcombe, D. C. 1997. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 276:1558-1560.

Ratcliff, F., MacFarlane, S. A., and Baulcombe, D. C. 1999. Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* 11:1207-1215.

Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A., and Baulcombe, D. C. 2001. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J* 25:237-245.

Register, J. C., and Beachy, R. N. 1988. Resistance to TMV in transgenic plants results from interference with an early event in infection. *Virology* 166:524-532.

Roossinck, M. J., Zhang, L., and Hellwald, K. H. 1999. Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analysis of cucumber mosaic virus RNA3 indicate radial evolution of three subgroups. *J. Virol* 73:6752-6758.

斎藤猛雄・佐藤隆徳・松永 啓・吉田健実・斎藤 新・山田朋宏・門馬信二 2007. 遺伝子組換えトマトを利用したモザイク病 (CMV)抵抗性トマト素材系統 'AT-CM01' の開発. *野菜茶研研報* 6:13-22.

Salánki, K., Carrère, I., Jacquemond, M., Balázs, E., Tepfer, M. 1997. Biological properties of pseudorecombinant and recombinant strains created with cucumber mosaic virus and tomato aspermy virus. *J Virol* 71: 3597-3602

Sanchez, F., Martinez-Herrera, D., Aguilar, I., and Ponz, F. 1998. Infectivity of turnip mosaic potyvirus cDNA clones and transcripts on the systemic host *Arabidopsis thaliana* and local lesion hosts. *Virus Res* 55:207-219.

Sano, Y., and Kojima, M. 1989. Increase in cucumber mosaic virus concentration in Japanese radish plants co-infected with turnip mosaic virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn* 55:296-302.

佐山春樹 2003. 弱毒キュウリモザイクウイルス(CMV)を利用したトマトのモザイク病防除. *農業技術* 58:307-311.

Savenkov, E. I., and Valkonen, J. P. T. 2001. Coat protein gene-mediated resistance to *Potato virus A* in transgenic plants is suppressed following infection with another potyvirus. *J. Gen. Virol* 82:2275-2278.

Scholthof K.B., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C. and Foster G.D. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 12, 938–954.

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

Shattuck, V. I. 1992. The biology, epidemiology and control of turnip mosaic virus. *Plant Breed. Rev* 14:199-238.

Shi, B-J., Palukaitis, P., and Symons, R. H. 2002. Differential virulence by strains of cucumber mosaic virus is mediated by the 2b gene. *Mol. Plant-Microbe Interact* 15:947-955.

Shi, B-J., Miller, J., Symons, R. H., and Palukaitis, P. 2003. The 2b protein of cucumoviruses has a role in promoting the cell-to-cell movement of pseudorecombinant viruses. *Mol. Plant-Microbe Interact* 16:261-267.

清水 茂・金澤幸三・河野久芳・横田良夫 1963. ダイコンのウイルス病抵抗性育種に関する研究. 園試報 A2:83-106.

Simón-Mateo, C., López-Moya, J. J., Guo, H. S., González, E., and García, A. 2003. Suppressor activity of potyviral and cucumoviral infections in potyvirus-induced transgene silencing. *J. Gen. Virol* 84:2877-2883.

Shintaku, M., Zhang, L., and Palukaitis, P. 1992. A single amino acid substitution in the coat protein of cucumber mosaic virus induces chlorosis in tobacco. *Plant Cell* 4:751-757.

Shukla, D. D., and Ward, C. W. 1989. Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. *Arch. Virol* 106:171-200.

Shukla, D. D., Ward, C. W., and Brunt, A. A. 1994. Size and membership of the Potyviridae. *In* The Potyviridae, pp516, CAB International, Wallingford, UK.

Siddiqui, S. A., Valkonen, J. P. T., rajamaki, M-L., and Lehto, K. 2011. The 2b silencing suppressor of a mild strain of cucumber mosaic virus alone is sufficient for synergistic interaction with tobacco mosaic virus and induction of severe leaf malformation in 2b-transgenic tobacco plants. *Mol. Plant-Microbe Interact* 24:685-693.

Sijen, T., Wellink, J., Hiriart, J. B., and van Kammen, A. 1996. RNA-mediated virus resistance: Role of repeated transgenes and delineation of targeted regions. *Plant Cell* 8:2277-2294.

Smith, H. A., Swaney, S. L., Parks, T. D., Wernsman, E. A., and Dougherty, W. G. 1994. Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs: expression, regulation, and fate of nonessential RNAs. *Plant Cell* 6:1441-1453.

Smith, N. A., Singh, S. P., Wang, M. B., Stoutjesdijk, P. A., Green, A. G., and Waterhouse, P. M. 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407:319-320.

Soards, A. J., Murphy, A. M., Palukaitis, P., and Carr, J. P. 2002. Virulence and differential local and systemic spread of cucumber mosaic virus in tobacco are affected by the CMV 2b

protein. *Mol. Plant-Microbe Interact* 15:647-653.

Sonoda, S., Mori, M., and Nishiguchi, M. 1999. Homology-dependent virus resistance in transgenic plants with the coat protein gene of sweet potato feathery mottle potyvirus: Target specificity and transgene methylation. *Phytopathology* 89:385-391.

Stam, M., De Bruin, R., Kenter, S., van der Hooft R. A. L., van Blokland R., Mol, J. N. M., and Kooter, J. M. 1997. Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in *Petunia* by inverted transgene repeats. *Plant J* 12:63-82.

Stanford, J. C., and Johnson, S. A. 1985. The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome. *J. Theor. Biol* 113:395-405.

Suehiro, N., Natsuaki, T., Watanabe, T., and Okuda, S. 2004. An important determinant of the ability of Turnip mosaic virus to infect *Brassica* spp. and/or *Raphanus sativus* is in its P3 protein. *J. Gen. Virol* 85:2087-2098

Suzuki, M., Kuwata, S., Kataoaka, J., Masuta, C., Nitta, N., and Takanami, Y. 1991. Functional analysis of deletion mutants of cucumber mosaic virus RNA3 using an *in vitro* transcription system. *Virology* 183:106-113.

Suzuki, M., Kuwata, S., Masuta, C., and Takanami, Y. 1995. Point mutations in the coat protein of cucumber mosaic virus affected symptom expression and virion accumulation in tobacco. *J. Gen. Virol* 76:1791-1799.

Swaney, S., Powers, H., Goodwin, J., Silva Rosales, L., and Dougherty, W. G. 1995. RNA-mediated resistance with nonstructural genes from the tobacco etch virus genome. *Mol. Plant-Microbe Interact* 8:1004-1011.

Takeshita, M., Koizumi, E., Noguchi, M., Sueda, K., Shimura, H., Ishikawa, N., Matsuura, H., Ohshima, K., Natsuaki, T., Kuwata, S., Furuya, N., Tsuchiya, K., and Masuta, C. 2012. Infection dynamics in viral spread and interference under the synergism between cucumber mosaic virus and turnip mosaic virus. *Mol. Plant-Microbe Interact* 25:18-27.

Taliansky, M. E., Ryabov, E. V., and Robinson, D. J. 1998. Two distinct mechanisms of transgenic resistance mediated by groundnut rosette virus satellite RNA sequences. *Mol. Plant-Microbe Interact* 11:367-374.

Tan, Z., Gibbs, A. J., Tomitaka, Y., Sanchez, F., Ponz, F., and Ohshima, K. 2005. Mutations in turnip mosaic virus genomes that have adapted to *Raphanus sativus*. *J. Gen. Virol* 86:501-510.

Tenllado, F., and Diaz-Ruiz, J. R. 2001. Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. *J. Virol* 75:12288-12297.

Tennant, P. F., Gonsalves, C., Ling, K-S., Fitch, M., Manshardt, R., Slightom, J. L., and Gonsalves, D. 1994. Differential protection against papaya ringspot virus isolates in coat protein gene transgenic papaya and classically cross-protected papaya. *Phytopathology* 84:1359-1366.

Tezuka, N., and Ishii, M. 1983. Studies on strains of turnip mosaic virus (TuMV). I. A strain isolated from cabbage. *Bull. Veg. and Orn. Crops Res. Sta* 11:71-81.

Thomas, P. E., Lawson, E.C., Zalewski, J.C., Reed G. L., and Kaniewski, W. K. 2000. Extreme

resistance to potato leafroll virus in potato cv. Russet Burbank mediated by the viral replicase gene. *Virus Res* 71:49-62.

栃原比呂志 1965. ダイコンのモザイク病を起因するウイルスの同定ならびに血清学的比較研究. 農技研報 C18:1-52.

栃原比呂志・田村 実 1976. フキのウイルス. 日植病報 42:533-539.

Tomari, Y., and Zamore, P. D. 2005. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.* 19:517-529.

Tomlinson, J. A. 1987. Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. *Ann. Appl. Biol* 110:661-681.

Tomlinson, J. A., and Ward, C. M. 1982. Selection for immunity in swede (*Brassica napus*) to infection by turnip mosaic virus. *Ann. Appl. Biol* 101:43-50.

Tomimura, K., Gibbs, A. J., Jenner, C. E., Walsh, J. A., and Ohshima, K. 2003. The phylogeny of *Turnip mosaic virus*; comparisons of 38 genomic sequences reveal a Eurasian origin and a recent emergence in east Asia. *Mol. Ecol* 12:2099-2111.

Tricoli, D. M., Carney, K. J., Russell, P. F., McMaster, J. R., Grodd, D. W., Hadden, K. C., Himmel, P. T., Hubbard, J. P., Boeshore, M. L., and Quemada, H. D. 1995. Field evaluation of transgenic squash containing single and multiple coat protein gene constructs for resistance to *Cucumber mosaic virus*, *Watermelon mosaic virus 2*, and *Zucchini yellow mosaic virus*. *Bio/Tech* 13:1458-1465.

Tsuda, S., Kirita, M., and Watanabe, Y. 1998. Characterization of a pepper mild mottle tobamovirus strain capable of overcoming the L3 gene-mediated resistance, distinct from the resistance-breaking Italian isolate. *Mol. Plant-Microbe Interact* 11:327-331.

宇田川晃 1996. 神奈川県に発生した主なウイルス病. 関東東山病害虫研究会報 43:157-162.

植草秀敏・野村 研・北 宜裕 2003. RT-PCR による植物ウイルスの検出. 神奈川農総研報 143:61-69.

牛山欽司・亀谷満朗・花田 薫・小林正伸・北 宜裕・小川潤子 1991. トマトのえそ症状から分離されたジャガイモ Y ウイルスとそれによる病徴再現. 関東病虫研報 38:63-65.

Vance, V., and Vaucheret, H. 2001. RNA silencing in plants-defense and counterdefense. *Science* 292:2277-2280.

Vanitharani, R., Chellappan, P., Pita, J. S., and Fauquet, C. 2004. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *J. Virol* 78: 9487-9498

van Blokland, N., van der Geest, N., Mol, J. N. M., and Kooter, J. M. 1994. Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant J* 6:861-877.

van den Boogart, T., Lomonosoff, G. P., and Davies, J. W. 1998. Can we explain RNA-mediated virus resistance by homology-dependent gene silencing? *Mol. Plant-Microbe Interact* 11: 717-723.

van der Krol, A. R., Mur, L. A., Beld, M., Mol, J. N. M., and Stuitji, A. R. 1990. Flavonoid genes

- in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2:291-299.
- Vargason, J. M., Szittyá, G., Burgyan, J., Hall, T. M. T. 2003. Sizeselective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* 115: 799-811.
- Vaucheret, H., and Fagard, M. 2001. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet* 17:29-35.
- Voinnet, O., Vain, P., Angell, S., and Baulcombe, D. C. 1998. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* 95:177-87.
- Voinnet, O., Pinto, Y. M., and Baulcombe, D. C. 1999. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14147-14152.
- Voinnet, O., Lederer, C., and Baulcombe, D.C. 2000. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103: 157-167.
- Voinnet, O. 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet* 17:449-459.
- Voinnet, O. 2004. RNA silencing: no mercy for viruses? *Immunological Reviews* 198:85-303.
- Wahyuni, W. S., Dietzgen, R. G., Hanada, K., and Francki, R. I. B. 1992. Serological and biological variation between and within subgroup I and II strains of cucumber mosaic virus. *Plant Pathol* 41: 282-297.
- Walsh, J. A., Sharpe, A. G., Jener, C. E., and Lydiat, D. J. 1999. Characterisation of resistance to turnip mosaic virus in oilseed rape (*Brassica napus*) and genetic mapping of TuRBO1. *Theor. Appl. Genet* 99:1149-1154.
- Wang, Y., Gaba, V., Yang, J., Palukaitis, P. & Gal-On, A. 2002. Characterization of synergy between Cucumber mosaic virus and potyviruses in cucurbit hosts. *Phytopathology* 92: 51-58.
- Waterhouse, P. M., Graham, M. W., and Wang, M-B. 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13959-13964.
- Waterhouse, P. M., Wang, M-B., and Lough, T. 2001. Gene silencing as an adaptive defense against viruses. *Nature* 411:834-842.
- Weber, H., Sshulze, S., and Pfitzer, A. J. P. 1993. Two amino acid substitution in the tomato mosaic virus 30K-kilodalton movement protein confer the ability to overcome the Tm-2² resistance gene in the tomato. *J. Virol* 67:6432-6438.
- Wege, C., and D. Siegmund. 2007. Synergism of a DNA and an RNA virus: enhanced tissue infiltration of the begomovirus Abutilon mosaic virus (AbMV) mediated by Cucumber mosaic virus (CMV). *Virology* 357:10-28.
- Xu, L., Song, Y. Z., Zhu, J. H., Guo, X. Q., Zhu, C. X., and Wen, F. J. 2009. Conserved sequences of replicase gene-mediated resistance to Potyvirus through RNA silencing. *J. Plant Biol* 52:550-559.

- Ye, J., Qu, J., Zhang, J. F., Geng, Y. F., and Fang, R. X. 2009. A critical domain of the *Cucumber mosaic virus* 2b protein for RNA silencing suppressor activity. FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett 583:101-106.
- Yoon, J. Y., Green, S. K., and Opena, R. T. 1993. Inheritance of resistance to turnip mosaic virus in Chinese cabbage. Euphytica 69:103-108.
- Yoshii, H. 1963. On the strain distribution of turnip mosaic virus. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn 29:221-227.
- 吉田幸二 1986. サテライト RNA 置換による弱毒 CMV の作出. 植物防疫 40:510-515.
- Zang, L., Hanada, K., and Palukaitis, P. 1994. Mapping local and symptom determinants of cucumber mosaic cucumovirus in tobacco. J. Gen. Virol 75:3185-3191.
- Zang, X., Yuan, Y-R., Pei, Y., Lin, S-S., Tuschl, T., Patel, D. J., and Chua, N-H. 2006. Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. Genes Dev 20:3255-3268.
- 善林六朗・亀谷満朗 1986. CMV の弱毒系統によるトマトモザイク病防除の試み. 植物防疫 40:18-22.