

## 論文の内容の要旨

論文題目 ポティウイルス抵抗性植物の作出と解析

氏名 野村 研

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 T<sub>2</sub> 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) を示す個体が認められた。抵抗性系統の T<sub>1</sub> 世代で

は抵抗性と感受性が分離したが、T<sub>2</sub>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-*At*CP では TuMV-JO を、また *Nb*CP12-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-*At*CP 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-*At*CP 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。*Nb*CP12-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 *Nb*CP12-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、導入遺伝子に由来する 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で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。