

博士論文

フレキシウィルスの細胞間移行を阻害する
劣性抵抗性遺伝子に関する研究

桂馬 拓也

目次

第 1 章 緒論	4
1.1. 植物病	4
1.2. 植物ウイルスとは	4
1.2.1. 植物ウイルスによる病徴	4
1.2.2. 植物ウイルスの分類	6
1.2.3. 植物ウイルスの感染過程	7
1.3. 植物ウイルスに対する抵抗性機構	11
1.4. eukaryotic translation initiation factor 4E	16
1.5. アルファフレキシウイルス科、ベータフレキシウイルス科	20
 第 2 章 フレキシウイルスに対する劣性抵抗性遺伝子 nCBP の同定	 23
2.1. 序文	23
2.2. 材料および方法	25
2.2.1. アライメント解析ならびに系統解析	25
2.2.2. 供試植物	25
2.2.3. 供試ウイルス	25
2.2.4. プラスミドの構築	27
2.2.5. シーケンス解析	29
2.2.6. ウイルス接種	29
2.2.7. 接種植物の観察	31
2.2.8. 全 RNA の抽出、定量 RT-PCR 解析	32
2.2.9. RT-PCR 解析	34
2.2.10. 抗 nCBP 抗体の作出	34
2.2.11. ウェスタンブロット解析	36
2.2.12. フローラルディップ法による形質転換	38
2.3. 結果	40
2.3.1. ncbp 変異体の接種葉で PIAMV の蓄積量が減少する	40

2.3.2.	<i>ncbp</i> 変異体では PIAMV の全身感染が遅延する	44
2.3.3.	<i>ncbp</i> 変異体に <i>nCBP</i> 遺伝子を相補すると PIAMV の感染性が回復する	48
2.3.4.	<i>ncbp</i> 変異体では <i>Alphaflexivirus</i> 科ウイルスおよび <i>Betaflexivirus</i> 科ウイルスの蓄積量が減少する	55
2.4.	考察	58
2.4.1.	<i>ncbp</i> 変異体では PIAMV の蓄積量が低下する	58
2.4.2.	PIAMV の感染における <i>nCBP</i> の役割	59
2.4.3.	PIAMV の感染への eIF4E および eIFiso4E の関与	60
2.4.4.	<i>nCBP</i> は <i>Alphaflexivirus</i> 科ウイルスおよび <i>Betaflexivirus</i> 科ウイルスの感染に関わる	61

第 3 章 *nCBP* の欠損によるポテックスウイルスの感染阻害機構の解析 62

3.1.	序文	62
3.2.	材料および方法	65
3.2.1.	供試植物	65
3.2.2.	供試ウイルス	65
3.2.3.	プラスミドの構築	65
3.2.4.	パーティクルガンによるウイルス接種	65
3.2.5.	プロトプラストへのプラスミド導入	66
3.2.6.	プロトプラストからの RNA 抽出、DNase 処理、逆転写反応	68
3.2.7.	定量 RT-PCR 解析	68
3.2.8.	ノーザンブロット解析	68
3.2.9.	プロトプラストからのタンパク質抽出、ウェスタンブロット解析	70
3.2.10.	アグロインフィルトレーション	72
3.2.11.	シロイヌナズナ展開葉からのウイルスタンパク質の検出	72
3.2.12.	バンドの定量	73
3.3.	結果	75
3.3.1.	<i>ncbp</i> 変異体では PIAMV の細胞間移行が抑制される	75
3.3.2.	<i>ncbp</i> 変異体では PIAMV の単細胞における増殖は阻害されない	77

3.3.3.	プロトプラストにおけるウイルスタンパク質の検出	80
3.3.4.	<i>ncbp</i> 変異体では移行タンパク質 TGB2 および TGB3 の蓄積量が減少する	82
3.4.	考察	87
3.4.1.	nCBP は TGB2 および TGB3 の蓄積を促進する	87
3.4.2.	TGB2 および TGB3 の蓄積量低下は細胞間移行の阻害の原因となる	90
第 4 章 総合考察		93
4.1.	nCBP は TGB 型の移行タンパク質を有する <i>Alphaflexivirus</i> 科ウイルスおよび <i>Betaflexivirus</i> 科ウイルスの感染に関わる	93
4.2.	ウイルスのゲノム構造と翻訳開始因子の特異的利用	94
4.3.	<i>Potyvirus</i> 属ウイルスおよび <i>Tobamovirus</i> 属ウイルスと eIF4E アイソフォームとの関わり	97
4.4.	PIAMV が <i>ncbp</i> 変異体に全身感染する機構	99
4.5.	<i>nCBP</i> 遺伝子の抵抗性遺伝子資源としての有用性	100
4.6.	eIF4E アイソフォームは普遍的に植物ウイルスの感染に関わるか	101
摘要		103
謝辞		108
略語一覧		109
引用文献		112

第 1 章 緒論

1.1. 植物病

人類にとって植物はかけがえのないものである。人類は食糧として農産物を利用するのみならず、衣料品、医薬品、観葉植物、さらに近年ではエネルギー源としても活用しており、植物なくしては生活が成り立たないと言える。しかしながら、植物病により約 36% もの作物生産が失われていると推定されており (難波ら, 2008)、植物病の防除は人類の最重要課題の 1 つである。植物病の原因としては、菌類、細菌、ファイトプラズマ、線虫などの微生物、植物ウイルスおよびウイロイドに加え、害虫による食害、雑草との競合 (雑草害) や生育に不適切な環境 (生理障害) などがあげられる。作物生産の植物病による損失は年間 600 億ドルにも達すると推定されており、ウイルス病は菌類病に次いで 2 番目に大きな被害をもたらしている (Reddy et al., 2009)。

1.2. 植物ウイルスとは

1.2.1. 植物ウイルスによる病徴

病原体が宿主植物に感染し、その結果引き起こされる植物体の異常を病徴と呼ぶ。植物ウイルスによって引き起こされる病徴は、宿主植物種とウイルス種の組み合わせによって様々である (池上ら, 2009)。同一のウイルス種であっても分離株や系統によって、同一の植物種であっても品種、生育段階、温度等によって病徴が異なる (池上ら, 2009)。具体的な病徴の例としては、葉のモザイク症状や黄化症状、果実の輪紋症状、縮葉症状や壊死症状などがあげられる (図 1.1)。対照的に、植物にウイルスが感染しても病徴を伴わない無病徴感

染の場合もある。特定の宿主植物には激しい病徴を示すウイルスであっても、他の宿主植物には無病徴感染することがあり、感染源となる可能性がある。また、ウイルスによる病徴は生理障害と類似している場合があり、適切な処理がなされていない場合がある (Waterworth and Hadidi, 1998)。

ウイルスは他の病原体と比べてゲノムに変異が蓄積しやすいことが知られている。この結果として、新たな宿主への感染能を獲得する可能性や、強毒株の発生により病徴が激化する可能性がある。さらに、複数の植物ウイルスが同一の植物体に共感染した場合に、単独感染時と比べて病徴が激化する現象 (Synergism) が知られている。

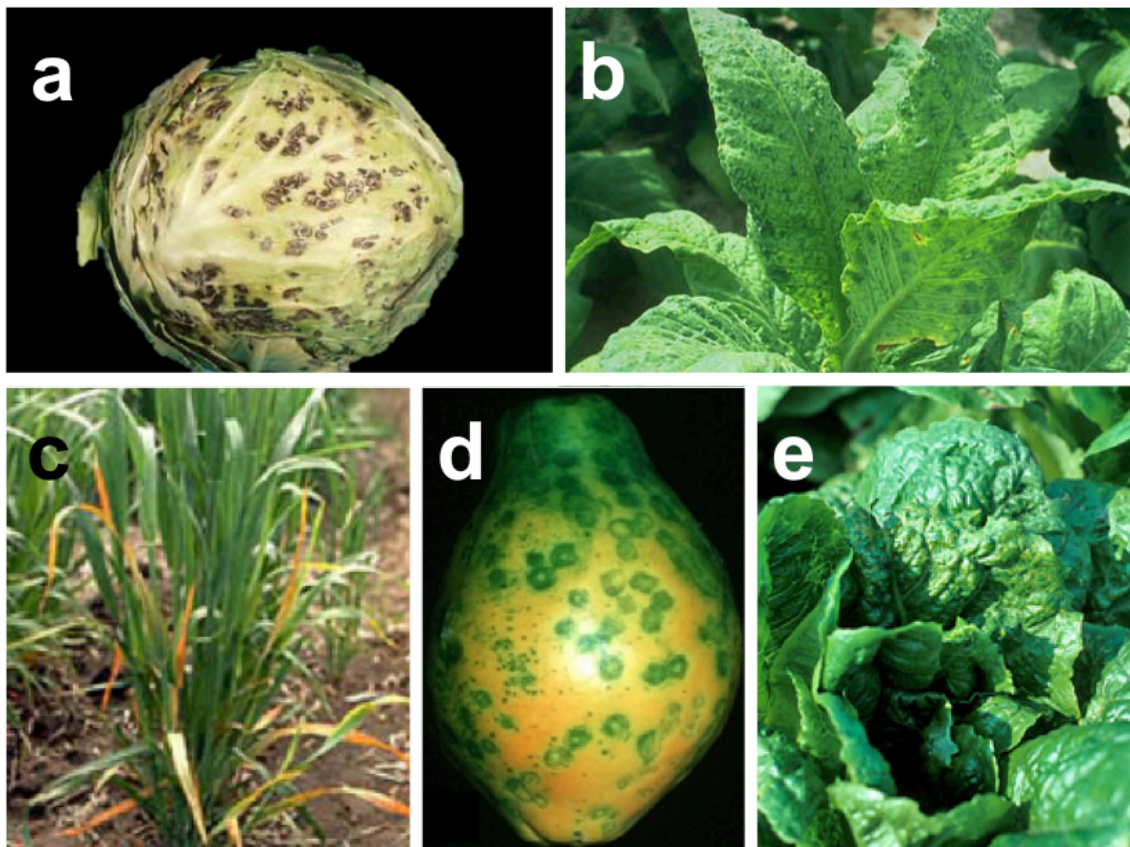


図 1.1 植物ウイルスによる症状

a. turnip mosaic virus によるキャベツの壊死症状、b. tobacco mosaic virus によるタバコのモザイク症状、c. barley yellow dwarf virus によるオオムギの黄化症状、d. papaya ringspot virus によるパパイヤの輪紋症状、e. cucumber mosaic virus によるレタスの縮葉症状

出典: A; Cornell University Vegetable MD Online, B-E; APS net

1.2.2. 植物ウイルスの分類

ウイルスは細胞構造を持たない無生物である。多くのウイルスは、タンパク質に核酸が包まれた粒子という形態を取る。ウイルスを構成する核酸は DNA もしくは RNA であり、これらはウイルスゲノムと呼ばれる。ウイルスはそのゲノムから、一本鎖 DNA ウィルス、二本鎖 DNA ウィルス、一本鎖 RNA ウィルス、二本鎖 RNA ウィルスに分けられる。一本鎖

RNA ウイルスは、ゲノム RNA 上に 5'末端から 3'末端の向きにタンパク質がコードされているプラス鎖 RNA ウイルス、3'末端から 5'末端の向きにコードされているマイナス鎖 RNA ウイルスに大きく分けられる。植物ウイルスではプラス鎖 RNA をゲノムとして持つものが 70%以上を占める (難波ら, 2008)。

1.2.3. 植物ウイルスの感染過程

プラス鎖 RNA ウイルスの植物への感染過程は大きく以下の 3 段階に分けられる。まず①植物ウイルスは侵入した細胞で増殖する (細胞内での増殖)。次いで、②原形質連絡 (plasmodesmata; PD) を通過し隣接細胞へ移行する (細胞間移行)。篩部組織へ到達したウイルスは③篩管内を移行 (長距離移行) し非感染組織へと侵入する (図 1.2)。

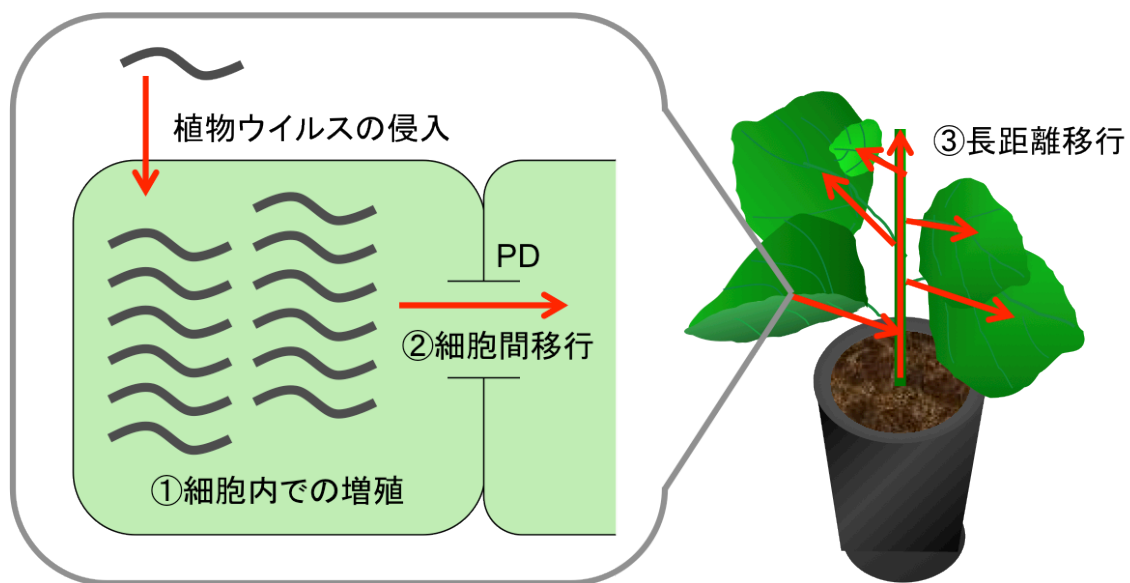


図 1.2 植物ウイルスの感染過程

植物ウイルスは宿主植物に侵入した後、①細胞内での増殖、②PD を通過する細胞間移行、③篩管内を移行する長距離移行を経て植物体全体に感染域を拡大する。

細胞内での増殖

植物ウイルスの多くは昆虫、線虫、菌類などの媒介生物を介して、もしくは感染植物と接触した農機具を介して伝染する。いずれの場合にもウイルスは粒子の状態で植物の細胞内に直接侵入する。以下の過程については図 1.3 と対応させて説明する。侵入したウイルス粒子は不安定となり粒子からゲノム RNA が放出される (①脱外被)。細胞質に露出したゲノム RNA を鋳型として、ウイルスタンパク質が翻訳される。多くのウイルスでは、5'末端の open reading frame (ORF) に複製酵素 (RNA-dependent RNA polymerase; RdRp) がコードされている (②RdRp の翻訳)。植物ウイルスはゲノム中に翻訳開始因子やリボソーム等の翻訳に必須な因子をコードしておらず、宿主の翻訳機構を利用していると考えられている。ウイルスが感染した細胞では、細胞内膜上に RdRp、宿主因子およびウイルス RNA からなる複製複合体 (viral replication complex; VRC) が形成され (③宿主因子のリクルートおよび④VRC の形成)、この内部で複製反応が行われる (Nagy and Pogany, 2012)。まず、ゲノム RNA の相補鎖であるマイナス鎖が、次いでマイナス鎖を鋳型としてプラス鎖が合成される (⑤複製)。ウイルスによっては、複製の過程でゲノム RNA と 3'末端を同じくするウイルス RNA (サブゲノム RNA) が合成される (⑥サブゲノム RNA の合成)。サブゲノム RNA の合成は、ゲノム RNA 中の 3'末端側に存在する ORF からウイルスタンパク質を翻訳するための戦略であると考えられている (Miller and Koev, 2000)。VRC 内に蓄積したゲノム RNA およびサブゲノム RNA は細胞質中に放出される (⑦プラス鎖 RNA の放出)。細胞質中に露出したゲノム RNA およびサブゲノム RNA は、RdRp もしくは、移行タンパク質 (movement protein; MP) や外被タンパク質 (coat protein; CP) などの翻訳鋳型となる (⑧RdRp の翻訳および⑧MP や CP の翻訳)。ゲノム RNA は粒子の中に格納されたり (⑨粒子形成)、MP の機能によって PD を通過し隣接細胞へ移行したりする (⑩細胞間移行)。

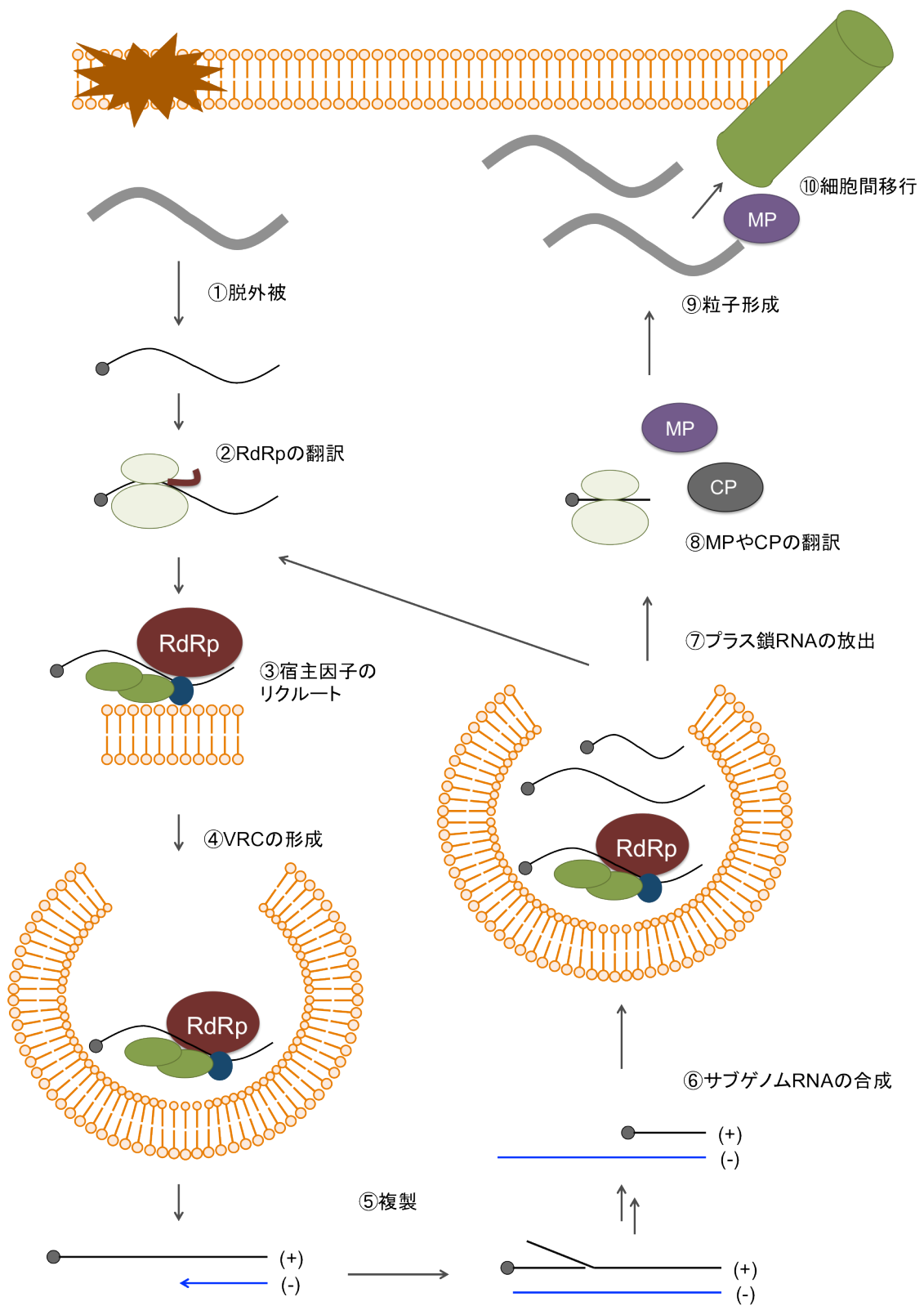


図 1.3 プラス鎖 RNA ウイルスの侵入細胞における感染過程

植物ウイルスは宿主細胞に侵入した後、粒子中のゲノム RNA を露出させる (①脱外被)。ゲノム RNA から複製酵素 (RdRp) が翻訳される (②RdRp の翻訳)。次いで、ゲノム RNA、複製酵素、宿主因子は宿主細胞の膜上で複製複合体を形成する (③宿主因子のリクルートおよび④VRC の形成)。VRC 内では複製酵素の機能によりマイナス鎖 RNA が合成され、マイナス鎖 RNA を鋳型にプラス鎖 RNA が合成される (⑤複製および⑥サブゲノム RNA の合成)。大量に蓄積したプラス鎖 RNA は細胞質中に放出され (⑦プラス鎖 RNA の放出)、新たな翻訳・複製のサイクルに入るか、もしくは粒子に格納され隣接細胞へと細胞間移行する (⑨粒子形成および⑩細胞間移行)。

細胞間移行

侵入細胞で増殖した植物ウイルスは、PD を通過して隣接細胞へ移行 (細胞間移行) する。この過程で中心的な役割を果たすウイルスタンパク質は MP である。一般的に MP には核酸と結合する活性があるとされる (Kumar et al., 2015)。また MP は微小管等の細胞骨格を介して細胞内を動くと考えられている (Kumar et al., 2015)。増殖したウイルスのゲノム RNA は、まず MP の機能により PD に局在する。この過程は細胞内移行と呼ばれる。

PD には通過できる限界の分子量 (排除分子量限界, size exclusion limit; SEL) があり、ゲノム RNA などの巨大分子は細胞間移行することができない。MP には SEL を拡大させる活性があり、この機能によりゲノム RNA は細胞間を移行することができる。ウイルス種によっては、MP に加えて細胞間移行に CP や RdRp を必要とするものも存在する (池上ら, 2009)。

長距離移行

ウイルスは細胞間移行を繰り返して維管束系へと侵入する。ウイルスは葉肉細胞から維管束鞘細胞、維管束柔細胞、伴細胞、篩部細胞へと感染域を広げ、篩管流に乗り上葉へと

移行（長距離移行）する。多くのウイルスは長距離移行に CP を必要とすることから（Brault et al., 2003; Zhang et al., 2013; Hipper et al., 2014）、粒子の形態で長距離移行すると考えられている。また、いくつかのウイルス種については篩管内に VRC 様の構造が認められており、ウイルスが複製・翻訳しつつ篩管内を移動しているというモデルが提唱されている（Wan et al., 2015）。

1.3. 植物ウイルスに対する抵抗性機構

ウイルス病による被害を軽減すべく、人類は様々な対策を講じてきた。細菌病や菌類病に対しては化学農薬による防除法や予防法が確立されつつあるが、現在のところ植物ウイルスに対して有効な化学農薬は存在しない。これは 1.2.項で述べたように、植物ウイルスはその感染過程を宿主植物に大きく依存しており、ウイルスの増殖のみを特異的に阻害することが難しいためである。そのため現行の植物ウイルスの防除は、媒介生物の駆除、健全苗の利用、弱毒ウイルスの利用といった耕種的な方法に限られている。

耕種的防除の一環として、限られた植物が有する抵抗性遺伝子の利用も行われている。20 世紀に入ってから、抵抗性遺伝子を導入した抵抗性品種の作出方法が開発され、農業現場で広く利用されてきた。抵抗性品種の利用は、防除効果が高い上に、特定の資材や労力を必要としないことから、効果的な防除法である（難波ら, 2008）。

植物ウイルスに対する抵抗性は、優性抵抗性遺伝子による抵抗性、RNA サイレンシングによる抵抗性、劣性抵抗性に大別される。

優性抵抗性遺伝子による抵抗性

植物は獲得免疫を持たず、その代替として病原体を特異的に認識し抵抗性反応を誘導す

る機構を有している。病原体を認識するセレプターの多くは NB-LRR 型 (nucleotide binding domain (NB)- leucine rich repeat (LRR) 型) である。NB-LRR 型遺伝子はシロイヌナズナに約 150 遺伝子存在すると推定されており (Meyers et al., 2003)、これらが植物ウイルスを始め様々な病原体の侵入を認識すると考えられている。本抵抗性が活性化される際には、NB-LRR 型 *R* (*resistance*) 遺伝子産物 (R タンパク質) がウイルスタンパク質を認識し、下流にシグナルが伝達される。その結果として、ウイルスは数十から数百細胞に感染したあたりで感染を拡大できなくなる (宮下、高橋, 2015)。このとき、ウイルスが感染した組織周辺では細胞死が起こることが知られている。この細胞死は、増殖に生細胞を必要とするウイルスの感染を阻害する効果を持つとされる (Lam et al., 2001)。この抵抗性は過敏感反応 (hypersensitive response; HR) と呼ばれる。

また、NB-LRR 型 *R* 遺伝子とは異なるタイプの優性抵抗性遺伝子による抵抗性も知られている。例えば、jacalin-type lectin required for potexvirus resistance 1 (JAX1) は *Potexvirus* 属ウイルスを認識し、単細胞 (1.2.2.項の細胞内での増殖) でウイルスの増殖を抑える強い抵抗性遺伝子産物である (Yamaji et al., 2012)。また、打破株を用いた解析から JAX1 抵抗性には *Potexvirus* 属ウイルスの RdRp が関わることが示唆されている (Sugawara et al., 2013)。

RNA サイレンシングによる抵抗性

RNA サイレンシングは配列特異的な RNA 切断機構であり、植物においては内在性遺伝子の発現調節機構として機能する他、ウイルスに対する抵抗性機構も担う。RNA サイレン

シングでは、ウイルス RNA の高次構造や複製中間体などの二本鎖 RNA が認識され、二本鎖 RNA 特異的 RNA 切断酵素により切断される。その際生じる small interfering RNA (siRNA) が RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる複合体を形成し、siRNA と相補的な配列を有する RNA を切断・分解することで、ウイルスの蓄積が阻害される。RNA サイレンシングを抑制するため、ウイルスはサイレンシングサプレッサーと呼ばれる、RNA サイレンシング経路のいずれかの段階を阻害するタンパク質をゲノム中にコードしている。

劣性抵抗性

植物ウイルスは宿主植物に感染する際に、多数の植物の因子（宿主因子）を必要とする (Nagy and Pogany, 2012)。したがって、ウイルスの感染過程に必須な宿主因子が欠損もしくは変異している植物では、ウイルスの感染が阻害される。このような抵抗性は、遺伝学的に劣性遺伝するという形質を有することから、劣性抵抗性と呼ばれている。

劣性抵抗性を有する作物が 1900 年代より報告されていた (Biffen, 1912)。劣性抵抗性は打破ウイルス株が出現しにくいため有用であると考えられていたが (Fraser, 1992)、ゲノム情報などの整備が進んでおらず解析が難航していた。この状況にブレイクスルーをもたらしたのは、モデル植物のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いた順遺伝学的解析であった。Carrington らは、*Potyvirus* 科 *Potyvirus* 属に属する *Tobacco etch virus* (TEV) が感染できなくなる機能欠損型変異体シロイヌナズナのスクリーニングを行い、当該変異体の原因遺伝子をクローニングした (Lellis et al., 2002)。その結果、TEV の感染性を決定した因子は翻訳開始因子 eukaryotic translation initiation factor (eIF) iso4E であった (Lellis et al., 2002) (翻訳開始因子の基本的な機能については 1.4. 項で述べる)。その後、多くの植物で劣

性抵抗性を担う遺伝子の解析が行われ、そのほとんどが eIF4E もしくは eIFiso4E をコードしていることが明らかになっている (Diaz-Pendon et al., 2004; Kang et al., 2005b; Wang and Krishnaswamy, 2012)。eIF4E もしくは eIFiso4E の欠損もしくは変異により抵抗性となるウイルスについても、*Potyvirus* 科 *Potyvirus* 属に属するウイルスのみならず (Lellis et al., 2002; Kang et al., 2005a; Sato et al., 2005; Ibiza et al., 2010; Piron et al., 2010)、*Potyvirus* 科 *Bymovirus* 属に属する *Barley yellow mosaic virus* および *Barley mild mosaic virus* (Kanyuka et al., 2005)、*Bromovirus* 科 *Cucumovirus* 属に属する *Cucumber mosaic virus* (CMV; Yoshii et al., 2004)、*Tombusvirus* 科 *Carmovirus* 属に属する *Melon necrotic spot virus* (MNSV) が報告されている (Diaz et al., 2004; Nieto et al., 2006; 表 1.1)。しかしながら、これら以外の植物ウイルスの感染に、eIF4E アイソフォームが関わるかどうかは明らかになっていない。

劣性抵抗性遺伝子産物の機能解析により、抵抗性の分子機構も明らかになってきた。シロイヌナズナの eIF4E は CMV の移行タンパク質 3a の翻訳に、メロン (*Cucumis melo*) の eIF4E は MNSV のウイルスタンパク質の翻訳に関わることが示されている (Yoshii et al., 2004; Truniger et al., 2008)。したがって、劣性抵抗性遺伝子の単離およびその機能解析をすることによって、抵抗性育種に資する遺伝子資源を増やすのみならず、ウイルスの感染戦略に関する理解を深めることができる。

表1.1 既報のeIF4EおよびeIFiso4Eを感染に利用しているウイルス

植物因子	植物種	ウイルス科	ウイルス属	ウイルス種	引用文献
eIF4E	<i>Capsicum</i> spp	Potyvirus科	Potyvirus属	PVY, TEV, PepMoV	Aryo et al., 1996; Ruffel et al., 2002; Moury et al., 2004; Ruffel et al., 2004; Kang et al., 2005a; Ayme et al., 2006; Ayme et al., 2007; Charron et al., 2008; Rubio et al., 2009; Ibiza et al., 2010; Moury et al., 2014
	<i>Lactuca sativa</i>	Potyvirus科	Potyvirus属	LMV	Nicaise et al., 2003; German-Retana et al., 2008
	<i>Pisum sativum</i>	Potyvirus科	Potyvirus属	PSBMV, BYMV, CIYV	Bruun-Rasmussen et al., 2007; Gao et al., 2004; Andrade et al., 2009; Ashby et al., 2011; Konecna et al., 2014
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Potyvirus科	Potyvirus属	BCMV, CIYV	Naderpour et al., 2010; Hart and Griffiths, 2013
	<i>Solanum habrochaites</i>	Potyvirus科	Potyvirus属	PVY, TEV	Ruffel et al., 2005
	<i>Citrullus lanatus</i>	Potyvirus科	Potyvirus属	ZYMV	Ling et al., 2009
	<i>Prunus armeniaca</i>	Potyvirus科	Potyvirus属	PPV	Marandel et al., 2009
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Potyvirus科	Potyvirus属	CIYV	Sato et al., 2005; Andrade et al., 2009
	<i>Solanum lycopersicum</i>	Potyvirus科	Potyvirus属	PVY, PepMoV	Piron et al., 2010
	<i>Cucumis melo</i>	Potyvirus科	Potyvirus属	MWMV, ZYMV, CVYV	Rodriguez-Hernandez et al., 2012
	<i>Solanum lycopersicum</i>	Potyvirus科	Potyvirus属	PVY, TEV, PepMoV, PepSMV, PPV, PepYMV, ERV	Mazier et al., 2011
	<i>Solanum tuberosum</i>	Potyvirus科	Potyvirus属	PVY	Cavatorita et al., 2011; Kim et al., 2014
	<i>Hordeum vulgare</i>	Potyvirus科	Bymovirus属	BaMMV, BaYMV	Kuhne et al., 2003; Kanyuka et al., 2004; Kanyuka et al., 2005; Stein et al., 2005; Hofinger et al., 2011; Perovic et al., 2014
	<i>Cucumis melo</i>	Tombusvirus科	Carmovirus属	MNSV	Diaz et al., 2004; Nieto et al., 2006; Truniger et al., 2008; Rodriguez-Hernandez et al., 2012; Miras et al., 2014
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cucumovirus科	Cucumovirus属	CMV	Yoshii et al., 2004
eIFiso4E	<i>Capsicum</i> spp	Potyvirus科	Potyvirus属	PVMV, ChiVMV	Ruffel et al., 2006; Rubio et al., 2009
	<i>Brassica rapa</i>	Potyvirus科	Potyvirus属	PPV, TuMV	Walsh et al., 2002; Rusholme et al., 2007; Nellist et al., 2014
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Potyvirus科	Potyvirus属	TuMV, LMV	Lellis et al., 2002; Duprat et al., 2002; Jenner et al., 2010
	<i>Prunus domestica</i>	Potyvirus科	Potyvirus属	PPV	Wang et al., 2013
	<i>Brassica rapa</i>	Potyvirus科	Potyvirus属	TuMV	Kim et al., 2014

表 1.1 既報の eIF4E および eIFiso4E を感染に利用するウイルス

既報の植物ウイルスの感染に関わる eIF4E アイソフォームをまとめた。以下に各ウイルス種の正式名称を記す。PVY (potato virus Y), PepMoV (pepper mottle virus), LMV (lettuce mosaic virus), PsBMV (pea seed-borne mosaic virus), BYMV (bean yellow mosaic virus), CIYVV (clover yellow vein virus), BCMV (bean common mosaic virus), ZYMV (zucchini yellow mosaic virus), PPV (plum pox virus), MWMV (moroccan watermelon mosaic virus), PepSMV (pepper severe mosaic virus), PepYMV (pepper yellow mosaic virus), ERV (ecuadorian rocoto virus), BaYMV (barley yellow mosaic virus), BaMMV (barley mild mosaic virus), CVYV (cucumber vein yellowing virus), PVMV (pepper vein mottling virus), ChiVMV (chilli veinal mottle virus).

1.4. eukaryotic translation initiation factor 4E

翻訳は mRNA からタンパク質を合成する過程であり、mRNA 上の開始コドンのリボソームが認識することで始まる。この翻訳開始の段階では、多くの翻訳開始因子が機能することが知られている。真核生物の翻訳開始因子 eIF4E はキャップ構造に結合し、足場タンパク質である eIF4G とともに複合体 (eIF4F と呼ばれる) を形成する (図 1.4)。eIF4G は polyA binding protein (PABP) と相互作用し、eIF4E、eIF4G、PABP を介して mRNA が環状構造を形成する (Robaglia and Caranta, 2006)。この環状構造は mRNA を安定化させるとともに、翻訳を終えたリボソームを mRNA の 5'末端へリクルートする際にも役立つと考察されている。次いで、eIF4G は eIF3 を介してリボソーム 40S サブユニットを mRNA の 5'非翻訳領域 (untranslated region; UTR) にリクルートする。40S サブユニットは 5'から 3'の向きに開始コドンの探索を行い、開始コドン上でリボソーム 60S サブユニットと会合し、80S リボソームを形成する。その後、タンパク質の合成が行われる。

既報で、真核生物の eIF4E アイソフォーム遺伝子の配列を用いた系統解析により、eIF4E アイソフォームは系統的に 3 つのサブグループに分類されることが明らかにされている (Joshi et al., 2005)。植物には 3 種類の eIF4E アイソフォーム (eIF4E、eIFiso4E、novel cap binding protein (nCBP)) が存在することが知られているが (Ruud et al., 1998)、eIF4E および eIFiso4E はサブグループ 1 に、nCBP はサブグループ 2 に分類され、nCBP が eIF4E および eIFiso4E と遠縁であることが示された (Joshi et al., 2005; 図 1.5)。この報告と一致して、シロイヌナズナの eIF4E および eIFiso4E のアミノ酸配列の同一性は 47.8%であるが、nCBP との同一性はそれぞれ 30.5%および 31.6%である (表 1.2)。シロイヌナズナでは、eIF4E および eIFiso4E のいずれかを欠損させても致死にはならないが二重変異体は致死であることから (Patric et al., 2014)、eIF4E および eIFiso4E が主要な役割を果たしており、これらの機能は重複していると考えられている (Kawaguchi and Bailey-Serres, 2002)。一方、nCBP も in vitro および in vivo でキャップ構造と結合することから (Ruud et al., 1998; Bush et al., 2009; Kropiwnicka et al., 2015)、翻訳の開始に寄与すると推定されている。

1.3 項で述べたように eIF4E および eIFiso4E は植物ウイルスの感染に関わることが報告されているが、nCBP の関与については知られていない。

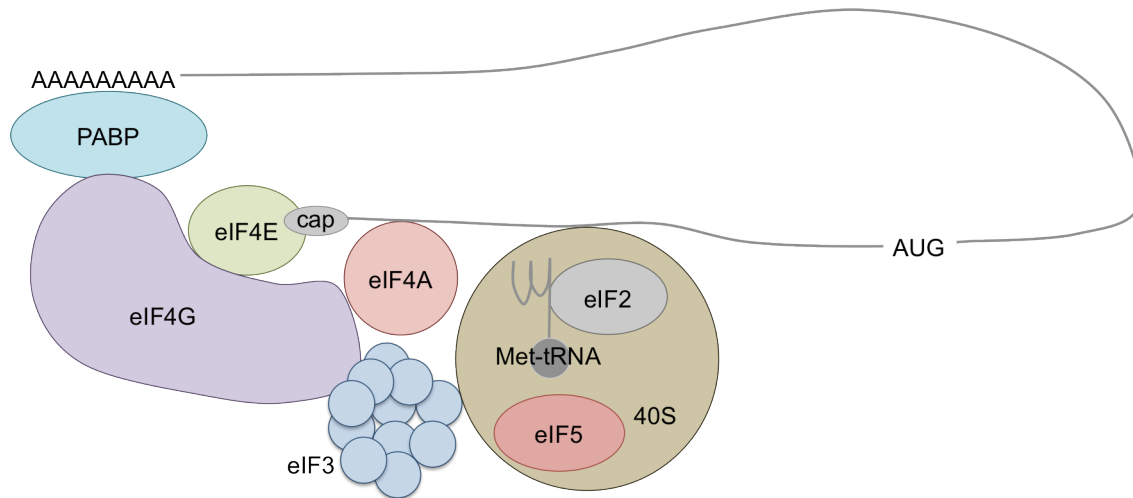


図 1.4 真核生物における翻訳開始因子によるリボソームのリクルート機構

mRNA 上のキャップ構造に、eIF4E および eIF4G からなる eIF4F 複合体が結合する。eIF4G は RNA ヘリカーゼである eIF4A、40S サブユニットと結合する eIF3、ポリ A 結合タンパク質である PABP と相互作用する。40S サブユニットには ternary complex と呼ばれる複合体 (eIF2-met-tRNA-GTP) が結合している。40S サブユニットが AUG を認識し 60S サブユニットと会合する際には、eIF5 依存的に GTP の加水分解が起こる。

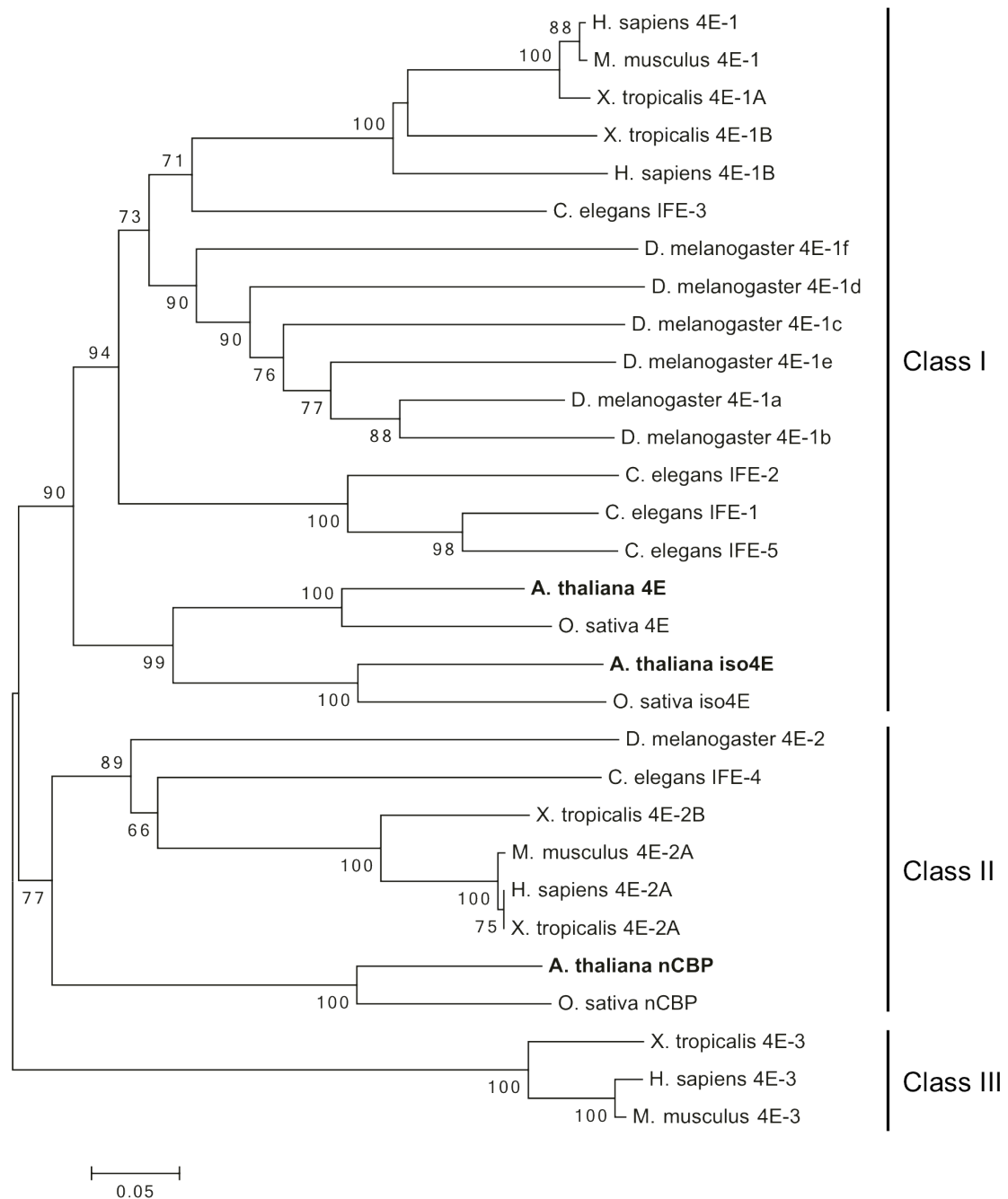


図 1.5 多様な真核生物の eIF4E アイソフォームの系統樹

各 eIF4E アイソフォームの全長アミノ酸配列を用いて作製した。シロイヌナズナの eIF4E、eIFiso4E および nCBP は太字で示した。系統関係から、eIF4E アイソフォームは Class I、Class II および Class III に分類される。

表 1.2 eIF4E アイソフォームの同一性比較

	eIF4E	iso4E	nCBP
eIF4E	-	47.8	30.5
eIFiso4E	60.2	-	31.6
nCBP	48.3	47.6	-

eIF4E、eIFiso4E および nCBP の同一性を比較した。赤い背景はアミノ酸配列の同一性、青い背景は核酸配列の同一性であることを示す。

1.5. アルファフレキシウイルス科、ベータフレキシウイルス科

Alphaflexivirus 科および *Betaflexvirus* 科は本論文で対象とするウイルスが属するウイルス科である。*Alphaflexivirus* 科および *Betaflexvirus* 科は似た性状を持ち、旧分類では同じフレキシウイルス科 (*Flexivirus* 科) に分類されていたことから、本論文ではこれらを総称してフレキシウイルスと呼ぶ。*Alphaflexivirus* 科および *Betaflexvirus* 科ウイルスはプラス 1 本鎖 RNA をゲノムとして持ち、470-1000nm の長さの粒子を形成する。ゲノム RNA の 5' 末端にはキャップ構造が、3'末端にはポリ A 配列が存在し、1-6 個のタンパク質がコードされている。5'末端の ORF にコードされているタンパク質は RdRp である。*Alphaflexivirus* 科ウイルスおよび *Betaflexvirus* 科ウイルスの RdRp には methyltransferase (MET)、helicase (HEL)、polymerase (POL) ドメインが保存されており、複数のウイルスの RdRp にはこれらのドメインに加えて alkylated DNA repair protein (AlkB) ドメインや papain-like protease (P-Pro) ドメインが存在することが報告されている。*Alphaflexivirus* 科ウイルスおよび *Betaflexvirus* 科 *Carlavirus* 属ウイルス、*Betaflexvirus* 科 *Foveavirus* 属ウイルスは RdRp の下流に triple-gene-block protein (TGB) 1, 2, 3 をコードしている (図 1.6)。これら 3 つのタンパク質はウイルスの細胞間移行に必須な MP である。その他の *Betaflexvirus* 科ウイルス

は単一の MP を有する。MP の下流には CP がコードされており、いくつかのウイルスでは CP の下流に Cystein Rich Protein (CRP) が存在する (図 1.6)。

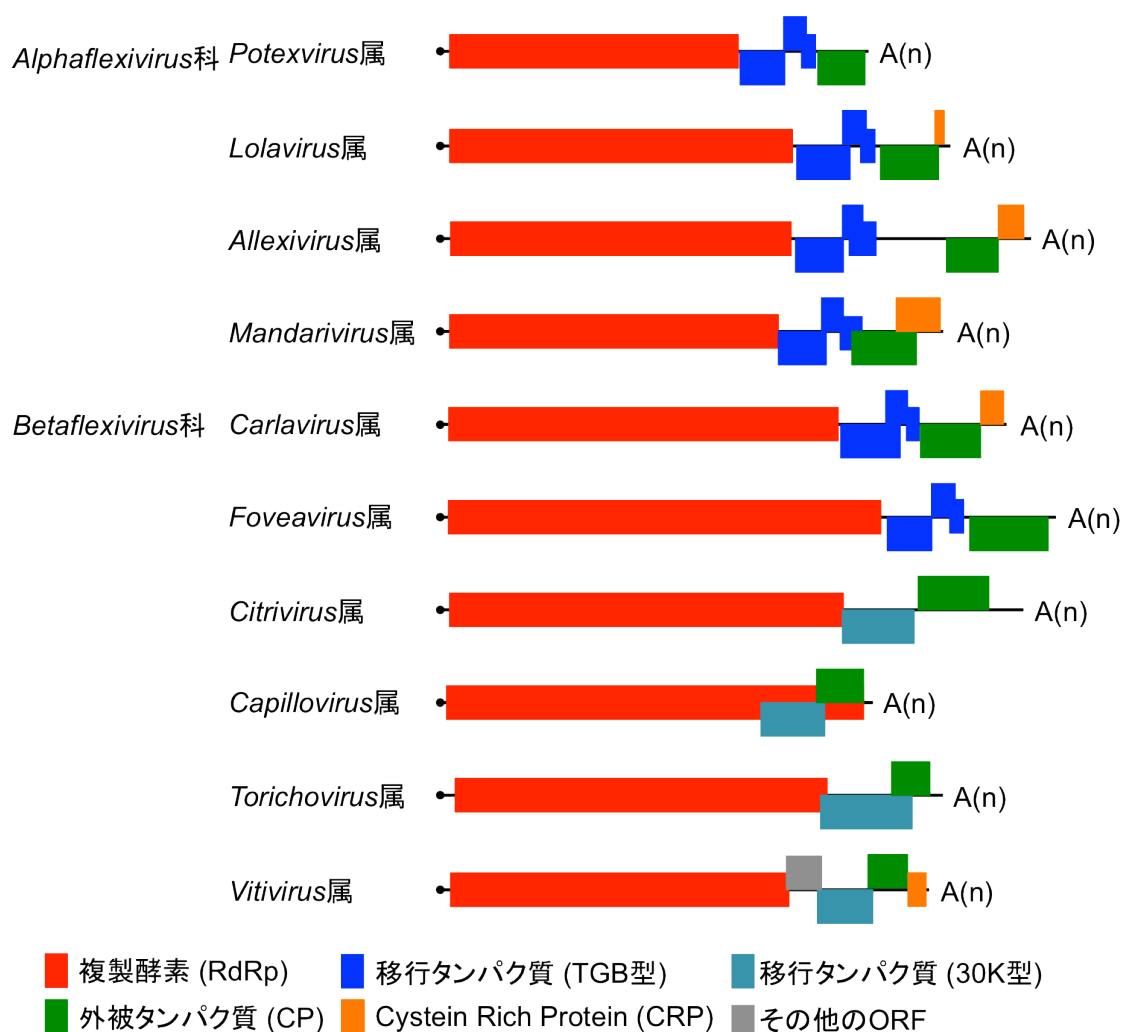


図 1.6 植物に感染する *Alphaflexivirus* 科および *Betaflexivirus* 科ウイルスのゲノム構造

Alphaflexivirus 科および *Betaflexivirus* 科ウイルスに分類される 10 属の典型的なゲノム構造の模式図を示した。直線はゲノム RNA を、黒い丸はキャップ構造を、ボックスは ORF を表す。各 ORF について、アノテーションごとに色を変えて示した。複製酵素 (赤色)、TGB 型の移行タンパク質 (濃青色)、タバコモザイクウイルスの 30K 型移行タンパク質 (薄青色)、外被タンパク質 (緑色)、Cystein Rich Protein (CRP: オレンジ色)、機能未知タンパク質 (灰白色) である。*Allexivirus* 属ウイルスの TGB3 タンパク質をコードする ORF の位置について

ては、Lezzhov らの報告に従った (Lezzhov et al., 2015)。ウイルスゲノムおよび各 ORF の長さは、各ウイルスのゲノム情報を反映させた。図の作製に当たっては、各ウイルスのタイプ種の配列を使用した。ただし、*Carlavirus* 属については、タイプ種である *Carnation latent virus* の全ゲノム配列が利用可能でないため、本論文で使った *Potato virus M* (PVM) の全ゲノム配列を使用した。以下に使用した配列のアクセッションナンバーを記す。*Potexvirus* 属: *Potato virus X* (AB056718)、*Lolavirus* 属: *Lolium latent virus* (EU489641)、*Allexivirus* 属: *Shallot virus X* (JX310755)、*Mandarivirus* 属: *Indian citrus ringspot virus* (NC_003093)、*Carlavirus* 属: PVM (KJ194171)、*Foveavirus* 属: *Apple stem pitting virus* (KF915809)、*Citrivirus* 属: *Citrus leaf blotch virus* (JN983456)、*Capillovirus* 属: *Apple stem grooving virus* (KU198289)、*Torichovirus* 属: *Apple chlorotic leaf spot virus* (KU870524)、*Vitivirus* 属: *Grapevine virus A* (AF007415)。

本論文はフレキシウイルスに対する抵抗性遺伝子資源の探索を目的として行った。本論文の第 2 章では、*Alphaflexivirus* 科および *Betaflexivirus* 科ウイルスの感染を阻害する劣性抵抗性遺伝子として同定した *nCBP* について述べる。次いで第 3 章では *Alphaflexivirus* 科 *Potexvirus* 属ウイルスの感染における *nCBP* の役割について述べる。

第 2 章 フレキシウイルスに対する劣性抵抗性遺伝子

nCBP の同定

2.1. 序文

農業上大きな被害をもたらす植物ウイルスを含むウイルス属として *Alphaflexivirus* 科 *Potexvirus* 属があげられる。例えば、potato virus X (PVX) はジャガイモ (*Solanum tuberosum*) に感染し、古くから作物の経済的価値を低下させてきた (明日山、平井, 1949; 奥良, 1962)。pepino mosaic virus はトマトに感染し、世界中で収量低下の原因となっている (Hanssen and Thomma, 2010)。cymbidium mosaic virus (CymMV) はラン科の植物に感染し、葉や花にモザイクや退緑斑を生じる (福田ら, 2003; 長井ら, 1995; Koh et al., 2014)。plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) はユリなどの花き植物に感染しえそ症状を引き起こす (竹内、佐々木, 2003)。ラン科やユリ科の植物は栄養繁殖により株を増やすことからウイルスが一度感染すると被害が大きく、花き植物の栽培における抵抗性品種作出の重要性は非常に高い。

当研究室では、*Potexvirus* 属ウイルスによる被害を軽減すべく、*Potexvirus* 属ウイルスに対する抵抗性遺伝子の探索を行ってきた (Yamaji et al., 2012; Hashimoto et al., 2016)。これまでに、蛍光タンパク質 GFP を発現する PIAMV が構築され (Minato et al., 2014)、PIAMV の植物への感染を簡易に判別する系が確立されている (Yamaji et al., 2012)。また、PIAMV はモデル植物のシロイヌナズナに感染する (Yamaji et al., 2012; Hashimoto et al., 2016)。これらの利便性を考え、本論文では PIAMV を用いて解析を行った。

Potexvirus 属に属するウイルスは、1.6.項で述べたようにプラス鎖 RNA をゲノムとして持ち、その 5'末端にはキャップ構造、3'末端にはポリ A 配列が存在する (Sonenberg et al., 1978; Dolja et al., 1987; 図 1.6)。ゲノム RNA には 5 つの ORF が存在し、5 末端から RdRp、TGB1-3、CP をコードしている。

1.3.項で述べたように、eIF4E アイソフォームが欠損した植物は *Potyvirus* 属ウイルス、*Bymovirus* 属ウイルス、*Cucumovirus* 属ウイルスおよび *Carmovirus* 属ウイルスに対して抵抗性を示すことが明らかになっている (表 1.1)。しかしながら、eIF4E アイソフォームの欠損による抵抗性が *Potexvirus* 属ウイルスに対して有効であるか否かは明らかでなかった。

2.2. 材料および方法

2.2.1. アライメント解析ならびに系統解析

eIF4E ファミリー遺伝子の cDNA 配列は National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)、Sol Genomics Network (<https://solgenomics.net>) および The Arabidopsis Information Resource (TAIR, <https://www.arabidopsis.org>) より取得した。得られた cDNA 配列をアミノ酸配列に変換した後、コア領域 (ヒトの eIF4E1 の His-37 から His-200 に相当する領域) を抽出し、ClustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>) によりマルチプルアライメントを行った。なお、パラメーターはデフォルトの設定で行った。eIF4E ファミリー遺伝子の系統樹は、コア領域の核酸配列を供試し、系統樹作製ソフトウェア MEGA5 を用いて近隣結合法により作製した。

2.2.2. 供試植物

本章では *Arabidopsis thaliana* および *Nicotiana benthamiana* を供試した。*A. thaliana* は野生型エコタイプ Columbia (Col-0) に加え、*eif4e* 変異体 (Yoshii et al., 1998; Yoshii et al., 1998 では *cum-1* と記載)、*eif4e1b* 変異体 (SALK_101805C)、*eif4e1c* 変異体 (SALK_053503C)、*eifiso4e* 変異体 (Duprat et al., 2002; Duprat et al., 2002 では *AteIF(iso)4E-1* と記載) および *ncbp-1* 変異体 (SALK_131503C)、*ncbp-2* 変異体 (SALK_146604) を供試した。*eif4e* 変異体、*eif4e1b* 変異体、*eif4e1c* 変異体、*ncbp-1* 変異体および *ncbp-2* 変異体は Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) より分譲を受けた。*eifiso4e* 変異体の種子は Karen S. Browning 博士より分譲していただいた。*A. thaliana* は人工気象室内 (23°C、15 時間明期/9 時間暗期) で、*N. benthamiana* は人工気象室内 (25°C、15 時間明期/9 時間暗期) で生育させた。

2.2.3. 供試ウイルス

本章では以下に述べる 7 種類のウイルスを供試した。以下に各ウイルスの由来を述べる。

(1) オオバコモザイクウイルス (plantago asiatica mosaic virus; PIAMV)

本章では PIAMV の分離株のうち、サクラソウ (*Primula sieboldii*) より単離された分離株 PIAMV-Pr (Komatsu et al., 2008) を用いた。所属研究室において、PIAMV-Pr の全長 cDNA 配列をバイナリーベクター pCAMBIA1301 にクローニングした感染性 cDNA クローン pCAM-Pr が既に構築されている。pCAM-Pr では、PIAMV-Pr の全長 cDNA は T-DNA 領域中のカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターの下流に挿入されている。さらに、

所属研究室において、pCAM-Pr の CP コード領域の N 末端側に GFP 遺伝子を挿入した変異 PIAMV (pCAM-Pr-GFP) が構築されている。本章ではアグロインフィルトレーション法により pCAM-Pr-GFP を *N. benthamiana* に接種し、全身感染した個体を機械接種源として用いた。

(2) alternanthera mosaic virus (AltMV)

本章では東京都内のイノコズチ (*Achyranthes bidentata*) より単離された分離株 AltMV-Ac (Iwabuchi et al., 2016; アクセションナンバー: LC107515) を使用した。所属研究室において、AltMV-Ac の全長 cDNA 配列をバイナリーベクター pCambia1301 に 35S プロモーターとともにクローニングした感染性 cDNA クローンが構築されている。この感染性 cDNA クローンをを用い、アグロインフィルトレーション法により AltMV-Ac を *N. benthamiana* に接種し、全身感染した個体を機械接種源として供試した。

(3) シンビジウムモザイクウイルス (cymbidium mosaic virus; CymMV)

本章では千葉県内のカトレヤ (*Cattleya* sp.) より単離された分離株 CymMV-J (アクセションナンバー: LC125633) を使用した。所属研究室において、CymMV-J の全長 cDNA 配列をバイナリーベクター pCambia1301 に 35S プロモーターとともにクローニングした感染性 cDNA クローンが構築されている。この感染性 cDNA クローンをを用い、アグロインフィルトレーション法により CymMV-J を *N. benthamiana* に接種し、全身感染した個体を機械接種源として供試した。

(4) lolium latent virus (LoLV)

本章では LoLV US1 分離株 (Vaira et al., 2008) を用いた。LoLV-US1 に感染した植物を John Hammond 博士 (United States Department of Agriculture) に分譲していただいた。この感染植物を接種源として *N. benthamiana* に機械接種した。本章では LoLV-US1 が全身感染した *N. benthamiana* を接種源として使用した。

(5) ジャガイモ M ウイルス (potato virus M; PVM)

本章では群馬県のジャガイモから単離された分離株 (堀尾ら, 1969) を使用した。本分離株に感染した植物をジーンバンクより分譲していただいた (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan (MAFF) 番号: 307027)。この感染植物を接種源として *N. occidentalis* に機械接種した。本章では PVM に全身感染した *N. occidentalis* を接種源として使用した。

(6) アブラナモザイクウイルス (youcai mosaic virus; YoMV)

本章では栃木県で単離されたワサビ系統を使用した。本分離株に感染した植物をジーンバンクより分譲していただいた。本章では YoMV が全身感染した植物を接種源として使用した。

(7) カブモザイクウイルス (turnip mosaic virus; TuMV)

本章では TuMV-Jo 分離株 (Nomura et al., 2004) を使用した。TuMV-Jo に感染した植物をジーンバンクより分譲していただいた (MAFF 番号: 01-04035)。この感染植物を接種源として *N. benthamiana* に機械接種した。本章では TuMV-Jo が全身感染した *N. benthamiana* を接種源として使用した。

2.2.4. プラスミドの構築

(1) *nCBP* 遺伝子のクローニング

nCBP 遺伝子を *ncbp-1* 変異体に形質転換するために、*nCBP* 遺伝子をプロモーター領域ならびにターミネーター領域とともにクローニングした。以下に、PCR の鋳型となる DNA の抽出方法、*nCBP* 遺伝子のクローニングを述べる。

DNA の抽出

DNA の抽出は CTAB 法により行った。まず、Col-0 の展開葉 0.3 g を液体窒素中で磨碎した。破碎した植物片に 900 μ l の CTAB バッファー (1.4 M NaCl, 1%(w/v) Polyvinyl-Pyrrolidone, 2%(w/v) CTAB, 0.1 M Tris, 20 mM EDTA, pH8.0) および 2 μ l の 2-メルカプトエタノールを加えた。CTAB バッファーをエッペンチューブに移し、65°C で 30 分静置した。静置後に 21,500 \times g、常温、5 分の条件で遠心し、上清を 2 本のエッペンチューブに分けて回収した。各チューブに 450 μ l のクロロホルム/イソアミルアルコールを加え、激しく攪拌した。各チューブを 21,500 \times g、常温、5 分の条件で遠心し、上清を回収した。上清を回収し、400 μ l の 2-プロパノールを加え、転倒混和した。21,500 \times g、常温、20 分の条件で遠心し、上清を回収した。上清を除去し、70%エタノールを 1 ml 加え、転倒混和した。21,500 \times g、4°C、5 分の条件で遠心し、上清を除去した。風乾によって沈殿を乾燥させ、200 μ l の DW に溶解させた。DNA の収量を分光光度計により確認した。

nCBP 遺伝子のプロモーター領域、コード領域、ターミネーター領域のクローニング

本章では、*nCBP* 遺伝子のクローニングに Gateway technology (Thermo Fisher Scientific) を利用した。Gateway technology は部位特異的組換え反応を利用したクローニング技術である。組換え配列として attL 配列および attR 配列を用いた。attL 配列を有する Entry vector に標的遺伝子をクローニングし、attR 配列を有する Destination vector との間の組換え反応 (LR 反応) により標的遺伝子を発現するベクターを構築した。本章では、attL 配列カセットを挿入した pENTA ベクター (Himeno et al., 2010) を Entry vector として使用した。

まず、抽出した DNA を鋳型として、プライマー SI-At5g18110-up1374F/Nt-At5g18110-down1011R を用いて PCR 増幅した。PCR 産物を電気泳動により分離し、目的の分子量に相当するバンドを切り出した。ゲル片から、illustra GFX PCR Purification Kit (GE Healthcare) を用いて DNA を回収した。回収した DNA (インサート) および pENTA ベクターを制限酵素 *SaI* および *NotI* で処理した。制限酵素処理産物を電気泳動により分離し、目的の分子量に相当するバンドを切り出した。切り出したゲル片から、illustra GFX PCR Purification Kit (GE Healthcare) を用いて DNA を回収した。インサート、ベクター、2×ライゲーションミックス (WaKo) を混ぜ、16°C で 30 分反応させた。ライゲーション産物を大腸菌 DH5 α に形質転換した。大腸菌を、選抜マーカーとして ampicillin を含む LB 固形培地 (1%(w/v) Bacto-tryptone (Difco)、0.5%(w/v) Yeast Extract (Difco)、1%(w/v) NaCl、1.5%(w/v) Agarose) に塗布し、37°C で一晩培養した。形成されたコロニーを、選抜マーカーとして ampicillin を含む LB 液体培地 (1%(w/v) Bacto-tryptone (Difco)、0.5%(w/v) Yeast Extract (Difco)、1%(w/v) NaCl) に移し、適度に濁るまで 37°C で震盪培養した。培養した大腸菌から DNA 自動分離装置 GENE PREP STAR PI-480 (クラボウ) を用いて DNA を抽出した。得られたプラスミドクローンに対して 2.2.5.項の方法でシーケンス解析を行い、不要な変異を持たないクローンを選抜した。得られたプラスミドを pENTA-*nCBP*g とした。

pENTA-*nCBP*g、pFAST01 (インプラントイノベーションズ)、Gateway LR クロナーゼ II 酵素ミックス (Thermo Fisher Scientific) を混ぜ、室温で一晩反応させた。反応産物を大腸菌 DH5 α に形質転換した。大腸菌を、選抜マーカーとして spectinomycin を含む LB 固形培地に塗布し、37°C で一晩培養した。形成されたコロニーを LB 液体培地 (spectinomycin を含む) に移し、適度に濁るまで 37°C で震盪培養した。培養した大腸菌から DNA 自動分離装置 GENE PREP STAR PI-480 (クラボウ) を用いて DNA を抽出した。得られた産物を pF01-*nCBP*g とした。

(2) 抗 *nCBP* 抗体の作出に向けた *nCBP* 遺伝子のクローニング

Col-0 から 2.2.8.項と同様の方法で調製した cDNA を鋳型として、プライマー Nd-AtnCBP-1F/

Xh-AtnCBP-663R を用いて PCR 増幅した。PCR 産物を電気泳動により分離し、目的の長さに相当するバンドを切り出した。ゲル片から、illustra GFX PCR Purification Kit (GE Healthcare) を用いて DNA を回収した。回収した DNA (インサート) および pET30a ベクターを制限酵素 *NdeI* および *XhoI* で処理した。制限酵素処理産物を電気泳動により分離し、目的の分子量に相当するバンドを切り出した。ゲル片から、illustra GFX PCR Purification Kit (GE Healthcare) を用いて DNA を回収した。インサート、ベクター、2×ライゲーションミックス (WaKo) を混ぜ、16°C で 30 分反応させた。ライゲーション産物を大腸菌 DH5 α に形質転換した。大腸菌を、選抜マーカーとして kanamycin を含む LB 固形培地に塗布し、37°C で一晩培養した。形成されたコロニーを LB 液体培地 (kanamycin を含む) に移し、適度に濁るまで 37°C で震盪培養した。10.の培地から DNA 自動分離装置 GENE PREP STAR PI-480 (クラボウ) を用いて DNA を抽出した。得られたプラスミドクローンに対して 2.2.5. 項の方法でシーケンス解析を行い、不要な変異を持たないクローンを選抜した。得られたプラスミドを pET30a-nCBP とした。

2.2.5. シーケンス解析

以下の反応液を調製し、以下の条件で反応を行った。なお、Premix および 5× Seq buffer は Applied Biosystems 社のものを用いた。

PreMix	0.5 μ l	96°C	3 分	25 サイクル
5× Seq buffer	1.75 μ l	96°C	15 秒	
プライマー	0.5 μ l	48°C	30 秒	
プラスミド	50-250 ng	60°C	4 分	
DW	Up to 10 μ l	4°C	∞	

カラム担体 (Sephadex G-50 SuperFine, Applied Biosystems) を用いて反応産物を精製した。精製された反応産物を約 60 分間遠心濃縮機にかけ、完全に乾燥させた。ウェルに 15 μ l のホルムアミドを入れ、激しく攪拌した。95°C、5 分間煮沸し、DNA を 1 本鎖の状態にした。その後すぐに氷水中に入れて急冷させた。サンプルを PRISM 3130 DNA Sequencer (Applied Biosystems) 内にセットし、塩基配列の解読を行った。

2.2.6. ウイルス接種

本章のウイルス接種試験では機械接種法を用いた。機械接種法は接触伝搬性ウイルスの自然界の感染条件に最も近い接種方法であると考えられている。以下で述べる様に、機械接種法の接種源としてはウイルスに全身感染した *N. benthamiana* もしくは *N. occidentalis*、*N. tabacum* を供試した。これらの接種源を調製する際には、アグロインフィルトレーション法により *N. benthamiana* および *N. occidentalis* にウイルスを接種した。以下に機械接種法およびアグロインフィルトレーション法の概略を述べる。

(1) 機械接種法

接種源として PIAMV-GFP、AltMV、CymMV、LoLV、PVM、TuMV、YoMV のいずれかに全身感染した *N. benthamiana*、*N. occidentalis* もしくは *N. tabacum* の上葉を用いた。いずれかのウイルスに感染した上葉 0.2g を液体窒素中で磨碎し、0.1 M リン酸バッファー (0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 M KH_2PO_4 , 0.1 M DTT, pH 7.0) を 1 ml 加えた。得られた粗汁液にカーボランダムを適量加え、Col-0 もしくは変異体シロイヌナズナにのロゼット葉に接種した。接種に際しては、葉 1 枚につき 10 μl の粗汁液をたらし、ゴムサック (AS ONE, 6-7934-02M) を着用した人差し指で一定方向に 10 回こすった。接種後に DW を用いて接種葉を洗った。

(2) アグロインフィルトレーション法

アグロインフィルトレーション法とは、*Agrobacterium tumefaciens* を展開葉に注入することで目的遺伝子を一過的に発現させる手法である。*A. tumefaciens* は自身の持つ Ti プラスミド (tumor-inducing plasmid) の T-DNA 領域 (transferred DNA region) に存在する遺伝子群を植物細胞内へと挿入し発現させることができる。この性質を利用し、T-DNA 領域に任意の遺伝子を組み込むことで目的遺伝子の一過的発現が可能となる。本章では、T-DNA 領域に 35S プロモーターならびにウイルスの全長 cDNA 配列を有するプラスミドを用いて *N. benthamiana* にウイルスを接種した。

以下に、*A. tumefaciens* のコンピテントセルの作製方法、*A. tumefaciens* へのバイナリーベクターの形質転換方法、アグロインフィルトレーション法を述べる (Johansen and Carrington, 2001)。

コンピテントセルの作製

-80°C で保存されている EHA105 菌株を用いてコンピテントセルを作製した。

まず、LB 液体培地にリファンピシンおよびクロラムフェニコールがそれぞれ終濃度 20 $\mu\text{g/ml}$ および 25 $\mu\text{g/ml}$ になるように添加した。この培地を用いて、EHA105 菌株を 28°C で

一晩震盪培養した。培養液 0.5 ml を抗生物質添加済みの LB 液体培地に植え継いだ。濁度 (OD_{600}) が 0.5 になるまで 28°C で震盪培養した。氷水上で 10 分程度静置し、急冷した。3,000 × g、4°C、5 分間遠心し、菌体を回収した。上清を捨てた後、0.2 μm のフィルターで滅菌した 20 mM $CaCl_2$ を 5 ml 加えて穏やかに懸濁させた。3,000 × g、4°C、5 分間遠心し、菌体を回収した。上清を捨て、0.2 μm のフィルターで滅菌した 20 mM $CaCl_2$ を 1 ml 加えて穏やかに懸濁させた。エッペンチューブに 50 μl ずつ分注し、液体窒素内で瞬間凍結させた。-80°C で保存した。

A. tumefaciens へのバイナリーベクターの形質転換方法

バイナリーベクターの *A. tumefaciens* への形質転換は freeze-thaw 法により行った (Höfgen et al., 1988)。以下に具体的な方法を述べる。

バイナリーベクター pCAM-Pr-GFP (約 200 ng) をエッペンチューブに分注し、10 μl の *A. tumefaciens* EHA105 菌株のコンピテントセルと混合した。分注したエッペンチューブを液体窒素内で瞬間凍結させた。氷上でエッペンチューブの温度を上昇させ、SOC 培地 (2%(w/v) Bacto-tryptone (Difco)、0.5%(w/v) Yeast Extract (Difco)、8.6 mM NaCl、2.5 mM KCl、10 mM $MgCl_2$ 、20 mM glucose) を 1 ml 加え、28°C で 3 時間震盪培養した。形質転換された *A. tumefaciens* を、選抜用の抗生物質 (kanamycin 50 μg/ml もしくは spectinomycin 100 μg/ml のいずれか) を含む LB 固形培地に塗布して 28°C で 2 日間培養した。

アグロインフィルトレーション

LB 固形培地に形成された *A. tumefaciens* のコロニーを、選抜用の抗生物質を加えた LB 液体培地に移した。LB 液体培地が適度に濁るまで、1-2 日間 28°C で震盪培養した。3,000 × g、25°C、10 分の条件で遠心した。上清を除き、アグロインフィルトレーションバッファー (10 mM $MgCl_2$ 、10 mM MES、150 μM acetosyringone, pH 5.7) に濁度 (OD_{600}) が 0.5 となるように懸濁した。室温、遮光下で 2 時間以上静置した。*N. benthamiana* の展開葉の背軸側より、1 ml シリンジを用いてアグロバクテリウムの懸濁液を注入した。

2.2.7. 接种植物の観察

PIAMV-GFP を接種した植物におけるウイルスの動態を明らかにするために、紫外線照射下で観察を行った。紫外線源として 365nm パワーUV-LED 照射装置 (ハイパワータイプ, オプトコード) を使い、黄色フィルターを装着したカメラ (Canon Digital Still Camera model EOS Kiss Digital, Canon) で撮影した。また、接種葉の観察に際しては、実体蛍光顕微鏡

(LEICA M165 FC, LEICA) を用いた。

2.2.8. 全 RNA の抽出、定量 RT-PCR 解析

接種葉におけるウイルスの蓄積量を解析するために、接種葉から全 RNA を抽出しリアルタイム RT-PCR 法により解析した。以下に、全 RNA の抽出、DNase 処理、逆転写反応、リアルタイム PCR の方法を述べる。

全 RNA の抽出

接種葉を 2.0 ml マスターハードチューブ (バイオメディカルサイエンス) に回収し、メタルコーン (バイオメディカルサイエンス) を入れ、液体窒素中で瞬間凍結した。2.0 ml チューブをシェイクマスターオート ver2.0 (バイオメディカルサイエンス) で破碎した。破碎した葉が溶ける前にセパゾール (ナカライテスク) を 1 ml 加え、ピペッティングにより丁寧に混和した。抽出液を新しいエッペンチューブに移し、200 μ l のクロロホルムを加え、転倒混和し、5 分間静置した。21,500 \times g、25°C、5 分の条件で遠心した。上清を回収し、あらかじめイソプロパノールを 500 μ l 分注したエッペンチューブに入れた。丁寧に転倒混和し、21,500 \times g、25°C、30 分の条件で遠心した。上清を除き、70%エタノールを 1 ml 加え、転倒混和し、21,500 \times g、25°C、3 分の条件で遠心した。上清を除き、もう一度洗浄を繰り返した。上清を除き、自然乾燥によりエタノールを蒸発させた。20 μ l の DW に溶解させ、分光光度計により収量を確認した。

DNase 処理

以下の DNase 反応液を調製し、37°C で 30 分間処理した。DNase I は Roche 社のものを使用した。

全 RNA	5 μ g
10 \times DNase I Buffer	10 μ l
Recombinant DNase I (RNase-free)	2 μ l (10 U)
RNase Inhibitor	20 U
DW	Up to 100 μ l

反応液に DW を 150 μ l、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) を 200 μ l 加え、激しく混和した。21,500 \times g、4°C、5 分の条件で遠心した。上清を回収し、ク

ロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を 200 μ l 加え、激しく混和した。21,500 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 分の条件で遠心した。上清を回収し、3 M 酢酸ナトリウムを 20 μ l、100%エタノールを 500 μ l 加え、転倒混和した。-80 $^{\circ}$ C で 10 分間静置した後、21,500 \times g、4 $^{\circ}$ C、30 分の条件で遠心した。上清を除き、70%エタノールを 1 ml 加え、21,500 \times g、4 $^{\circ}$ C、3 分の条件で遠心した。上清を除き、自然乾燥によりエタノールを蒸発させた。20 μ l の DW に溶解させ、分光光度計により収量を確認した。

逆転写

精製 RNA 500 ng を鋳型として逆転写反応を行った。反応は high capacity cDNA synthesis kit (Applied Biosystems) を使用した。反応液の組成および反応時間は以下の表の通りである。

MultiScribe RT enzyme	0.5 μ l (25 U)		
10 \times RT Buffer	1.0 μ l		
25 \times dNTPs (100mM)	0.4 μ l	25 $^{\circ}$ C	10 分
10 \times Random primers	1.0 μ l	37 $^{\circ}$ C	2 時間
Template RNA (500 ng)	-	4 $^{\circ}$ C	∞
DW	Up to 10 μ l		

リアルタイム PCR

以下の反応液を調製し、リアルタイム PCR 反応を行った。プライマーとしては、PIRep-F3/PIRep-R3 (PIAMV)、AltMV_rt_2280F/ AltMV_rt_2425R (AltMV)、CymMV-realt6F/CymMV-realt6R (CymMV)、LoLV_realt7F/ LoLV_realt7R (LoLV)、PVM-realt9F/PVM-realt1R-9R (PVM)、TuMV-rt1F/ TuMV-rt1R (TuMV)、YoMV_rt2F/ YoMV_rt2R (YoMV)、actin2F/ actin2R (*actin* mRNA) を使用した。本章では、内部標準遺伝子として *actin* 遺伝子を用いた。プライマーの配列は 2.2.項の最後に記載した。

本章では、リアルタイム PCR で得られた増幅産物が均一なものであることを確認するために Dissociation 反応を行った。本論文で述べる解析はいずれも、非特異的な増幅が生じていないことを確認している。

SYBR Green (TaKaRa)	12.5 μ l	95°C	30 秒	40 サイクル
プライマー	1 μ l ずつ	95°C	5 秒	
cDNA (100 倍希釈)	5 μ l	60°C	1 分	
DW	Up to 25 μ l	95°C	15 秒	
		60°C	30 秒	
		95°C	15 秒	

2.2.9. RT-PCR 解析

上葉におけるウイルスの蓄積量を解析するために、RT-PCR を行った。全 RNA 抽出ならびに逆転写は 2.2.8.項と同様に行った。ただし、PCR に供試する cDNA 量を統一するため、逆転写に際しては 500 ng の RNA を使用した。

PCR 増幅は以下の組成、反応条件で行った。ただし、PCR の増幅酵素は rTaq (TaKaRa) を使用した。プライマーは Pr-detF/ Pr-detR を用いた。プライマーの配列は 2.2.項の最後に表にまとめた。

10×Buffer	1 μ l	94°C	3 分	30 サイクル
dNTP mix	1 μ l	94°C	30 秒	
Primer	1 μ l	55°C	30 秒	
rTaq	0.1 μ l	72°C	1 分	
cDNA	1 μ l	72°C	7 分	
DW	Up to 10 μ l	4°C	∞	

2.2.10. 抗 nCBP 抗体の作出

nCBP 相補ラインで nCBP が蓄積しているかをウエスタンブロット解析により調べるために、抗 nCBP 抗体の作出を行った。大腸菌における nCBP の発現確認、nCBP の精製、抗 nCBP 抗体の作出は以下に述べる様に行った。

大腸菌における nCBP の発現確認

2.2.4.項で構築した pET30a-nCBP を導入した大腸菌 BL21 株を LB 液体培地 (Kanamycin

を含む) 1 ml に植え継ぎ、前培養として 37℃で一晩振盪培養した。本培養として前培養後の培養液 500 μ l を LB 液体培地 (Kanamycin を含む) 200 ml に加え、OD 値が 1.2 となるまで培養した。終濃度 1 mM となるように IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) を加え、nCBP の発現を誘導した。培養液を 37℃で震盪培養し、3 時間後まで 1 時間置きに 10 ml ずつ培養液を回収した。すべての培養液を 3,000 \times g、4℃、15 分の条件で遠心し、菌体を回収した。菌体に 400 μ l の 1 \times Binding buffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 5 mM imidazole) を加え、超音波破砕器 (Branson Sonifier, Emerson) により菌体を破砕した (出力 30%、2 分の条件)。破砕液を 21,500 \times g、4℃、15 分の条件で遠心し、可溶性画分と不溶性画分に分けた。不溶性画分に 500 μ l の 1 \times Binding buffer を加え、再懸濁した。可溶性画分および不溶性画分に 4 \times SDS-PAGE sample buffer (0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 8%(w/v) SDS, 40%(v/v) グリセロール, 0.01-0.1%(w/v) Bromophenol Blue (BPB)) を加えた。抽出液を 95℃で 5 分間処理した後、氷上で急冷した。これらのサンプルを 2.2.11.項と同様に SDS-PAGE に供試した。泳動後のゲルを CBB 染色により染色し、nCBP の発現の有無を観察した。

nCBP の精製

前述の方法で nCBP の発現を誘導した。培養液を 3,000 \times g、4℃、15 分の条件で遠心し、菌体を回収した。回収した菌体に 20 ml の Triton を含む 1 \times Binding buffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 5 mM imidazole, 0.2%(v/v) Triton-X) を加え、菌体を超音波破砕器 (Branson Sonifier, Emerson) により破砕した (出力 30%、溶液の白濁がなくなるまで行った)。17,400 \times g、4℃、15 分の条件で遠心し、上清を除去し不溶性画分を回収した。不溶性画分に 20 ml の Triton を含む 1 \times Binding buffer を加えた。菌体を懸濁させ、17,400 \times g、4℃、15 分の条件で遠心した。上清のうち 50 μ l を sup-1 として回収し、残りを除去した。上記の洗浄作業を合計 3 回繰り返した。上清のうち 50 μ l を sup-2、sup-3 として回収し、残りを除去した。不溶性画分に 20 ml の Urea を含む 1 \times Binding buffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH7.9, 5 mM imidazole, 6 M Urea) を加え、よく懸濁させ、4℃で 1 時間静置した。この段階で 50 μ l を採取し、ppt として 4℃で保存した。

カラムを準備した。まず、PD-10 カラム (GE healthcare) に Ni-NTA アガロース (キアゲン) を 2 ml 加え、カラムを作製した。3 ml の DW をアプライして担体を洗浄した。5 ml の Charge Buffer (50 mM NiSO₄) をアプライして担体にニッケルイオンをキレートした。3 ml の Urea を含む 1 \times Binding buffer をアプライし、カラムを平衡化した。

上述の 4℃で 1 時間静置で静置した懸濁液を 17,400 × g、4℃、15 分の条件で遠心し、上清をカラムにアプライした。カラムの通過液のうち 50 µl を FT-1 として回収した。残りを再度カラムにアプライした。カラムの通過液のうち 50 µl を FT-2 として回収した。残りを再度カラムにアプライした。カラムに 10 ml の Urea を含む 1 × Binding buffer をアプライし、カラムを洗浄した。カラムの通過液のうち 50 µl を Bind として回収した。カラムに 6 ml の 6M Urea 入り Wash Buffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 60 mM imidazole) をアプライし、カラムを洗浄した。カラムの通過液のうち 50 µl を Wash として回収した。カラムに 3 ml の 6 M Urea 入り Elute Buffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 1 M imidazole) をアプライし、nCBP を溶出した。カラムの通過液のうち 50 µl を Elu-1 として回収した。溶出作業をもう 2 回行った。カラムの通過液のうち 50 µl を Elu-2、Elu-3 として回収した。sup-1、sup-2、sup-3、ppt、FT-1、FT-2、FT-3、Bind、Wash、Elu-1、Elu-2 に 4 × SDS-PAGE sample buffer を 17.3 µl を加えた。各サンプルを 95℃で 5 分間処理した後、氷上で急冷した。これらのサンプルを 2.2.11.項と同様に SDS-PAGE に供試した。泳動後のゲルを CBB 染色により染色し、nCBP が精製されていることを観察した。得られた精製 nCBP を家兎に免疫し、抗 nCBP 抗体を得た。なお、免疫および採血の作業はユーロフィングジェノクミス社に外注した。

2.2.11. ウェスタンブロット解析

タンパク質の抽出

Col-0、*ncbp-1* 変異体、nCBP 相補ライン#1A、#3E、#3F の展開葉をエッペンチューブに入れ液体窒素中で凍結させた。液体窒素で冷やしつつ、展開葉をペッスルで磨砕した。破碎した葉に 2 × GSB (20%(v/v) glycerol, 250 mM Tris, 4%(w/v) SDS, 200 mM DTT, 0.01%(w/v) BPB) を植物体 50 mg に対して 250 µl の割合で加えた。ピペティングで破碎した植物と 2 × GSB を混ぜた後、70℃で 10 分間静置した。氷上で急冷した後、16100×g、25℃、4 分の条件で遠心し、上清を回収した。

SDS-PAGE

本章では、SDS-PAGE のゲルおよびバッファーとして、NuPAGE Bis-Tris gel 12% (Thermo Fisher Scientific) および MES Buffer (Thermo Fisher Scientific) を使用した。

SDS-PAGE 用のゲルを泳動槽 (XCell SureLock® Mini-Cell, Thermo Fisher Scientific) にセットした。泳動槽に泳動バッファーを注ぎ、ウェルを洗浄した。サンプルをアプライし、180 V、45 分の条件で泳動した。

メンブレンへの転写

泳動したゲルをブロッキングバッファー (25 mM Tris、192 mM glycine、20%(v/v) メタノール) に浸した。メンブレン (イモビロン-P, ミリポア) を 100%メタノールに浸し、1 分間震盪した。メンブレンおよびろ紙 2 枚をブロッキングバッファーに浸した。ブロッキング槽 (ミニトランスブロットセル, Bio Rad) にゲルおよびメンブレンをセットした。具体的には、ゲルホルダーの黒い側を下に敷き、その上にファイバー、ろ紙、ゲル、メンブレン、ろ紙、ファイバーの順に載せた。ゲルホルダー、アイスクリーニングユニットをブロット槽に入れ、ブロット槽をブロッキングバッファーで満たした。100V、1 時間の条件で転写した。転写中はスターラーでブロット槽を攪拌することで槽内の温度が均一となるようにした。

ブロッキング反応

目印として転写したメンブレンの左上を切り取り、メンブレンの上下の向きが分かるようにした。メンブレンをブロッキングバッファー (5%(w/v) スkimミルク、1×PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4)、0.05 %(v/v) Tween20) に浸し、1 時間震盪した。ブロッキングバッファーを除去し、PBST (1×PBS、0.05%(v/v) Tween20) にメンブレンを浸した。

抗体反応および検出

2.2.10 項で作製した抗 nCBP 抗血清を Can Get Signal Solution I (ToYoBo) に 2,000 倍になるように希釈し、一次抗体液とした。ハイブリバック (ハイブリ・バック・ハード, コスモバイオ) にメンブレンと一次抗体液を入れ、密封した。28°C で 40 分間抗体を反応させた。メンブレンを一次抗体液から取り出し、PBST に浸した。2 分間震盪し、PBST を除き、再び PBST を注いだ。上記の洗浄を合計 5 回繰り返した。抗ウサギ抗体 (Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey, GE Healthcare) を Can Get Signal Solution II (ToYoBo) で 3,000 倍になるように希釈し、二次抗体液とした。ハイブリバックにメンブレンと二次抗体液を入れ、密封した。28°C で 40 分間抗体を反応させた。2 分間震盪し、PBST を除き、再び PBST を注いだ。上記の洗浄を合計 5 回繰り返した。メンブレンに検出液 (Clarity Western ECL Substrate, Bio Rad) を滴下し、LAS4000 mini で検出した。検出後のメンブレンを CBB Stain One (Wako) で染色した。

2.2.12. フローラルディップ法による形質転換

本章では pFAST ベクター (インプラントイノベーションズ) を用いて形質転換体の作出を行った。本ベクターには種子特異的なプロモーター (pOLE) に GFP 遺伝子が連結されたシストロンが含まれており、形質転換体の選抜に際しては種子の GFP 蛍光の有無を指標とすることが可能である (Shimada et al., 2010)。

pF01-nCBPg を形質転換した *A. tumefaciens* を LB 液体培地 (選抜マーカーとして spectinomycin 100ppm を添加した) で適度に濁るまで 28°C で培養した。培養液を 3,000 × g、25°C、10 分の条件で遠心した。上清を除き、5%(w/v) sucrose に濁度 (OD₆₀₀) が 0.8 となるように懸濁した。sucrose 液に Silwet L-77 (バイオメディカルサイエンス) を終濃度 0.02%(v/v) となるように加えた。花芽を付けた *ncbp-1* 変異体から、開花済みの花をはさみで切り取った。処理した個体の花芽に調整した sucrose 液を 1 秒間浸した。暗所で 1 晩静置し、人口気象室に戻した。種子が形成されたら回収し、実体蛍光顕微鏡 (LEICA M165 FC, LEICA) 下で GFP 蛍光の有無を観察した。

表 2.1 本章で使したプライマー配列

プライマー名	配列 (5'-3')
PIRep-F3	AATCCCCAGACTTCCATGAGCACC
PIRep-R3	TTTTCTTTGCGCCGAGCTTCTC
actin2F	GCACCCTGTTCTTCTTACCG
actin2R	AACCCTCGTAGATTGGCACA
Pr-det-F	AACTGGCCACAATCACCCAGGGG
Pr-det-R	CTAGTCGGAGGGGGAAGGG
AltMV_rt_2280F	CCCCACTCCCTTTTCTCC
AltMV_rt_2425R	ATTGGCGTTGACCATTCTCC
CymMV-realt6F	CCCCGAGGATGTTATAGAAGGA
CymMV-realt6R	GGTATCTGGTGGCGTTGTAGG
LoLV_realt7F	CAGCAATGCGAGGGACTATCTAC
LoLV_realt7R	TGTCGGGGTTTGAGTTTGG
PVM-realt9F	GCTACAGGTGTGCTTGGATCTG
PVM-realt1R-9R	TGCCCGACCCAAAAGTG
TuMV-rt1F	GGAGGAGGAGAAGAAGGAGAGAG
TuMV-rt1R	TCCAGAGGTTCCAGCGTTTAC
YoMV_rt2F	TACTACAACGCTTTATCCGAGCTGTC
YoMV_rt2R	TTATCGCCACCACCACCTTTG
Sl-At5g18110-up1374F	ACGCGTCGACATTAGTTATACACTTTTCC
Nt-At5g18110-down1011R	ATAAGAATGCGGCCGCTGTTGCCAAAGAATTGG
Nd-AtnCBP-1F	AATTCATATGGAGGTTTTGGATAGGA
Xh-AtnCBP-663R	AATTCTCGAGTCCTCTCAGCCATGTGTTTC

2.3. 結果

2.3.1. *ncbp* 変異体の接種葉で PIAMV の蓄積量が減少する

シロイヌナズナのゲノム中には3種類の eIF4E アイソフォーム (eIF4E、eIFiso4E、nCBP) がコードされており、さらに eIF4E には2つのホモログ (eIF4E1b、eIF4E1c) が存在する (図 2.1)。そこで、これらが PIAMV の感染に関わるか否かを解析するために、いずれかを欠損したシロイヌナズナ変異体を用いて接種試験を行った。本実験では、PIAMV の感染を可視化するために蛍光タンパク質 GFP を発現する PIAMV-GFP を供試した。各変異体に PIAMV-GFP を機械接種法により接種し、4 日後に接種葉を観察したところ、*eif4e* 変異体、*eif4e1b* 変異体、*eif4e1c* 変異体、*eifiso4e* 変異体では野生型シロイヌナズナ (アクセッション: Col-0) と同等の大きさの蛍光斑が観察された (図 2.2a)。一方、*ncbp-1* 変異体および *ncbp-2* 変異体 (*ncbp-1* 変異体では4番目のエキソンに、*ncbp-2* 変異体では5' UTRに T-DNA が挿入されている; 図 2.3) では、Col-0 と比べて蛍光斑が小さくなっていた (図 2.2a)。接種葉におけるウイルス蓄積量を定量的に解析するために、各接種葉から RNA を抽出し定量 RT-PCR 法により解析した。その結果、*eif4e* 変異体、*eif4e1b* 変異体、*eif4e1c* 変異体、*eifiso4e* 変異体における PIAMV の相対蓄積量は、Col-0 における相対蓄積量と同等であった (図 2.2b)。これに対して、*ncbp-1* 変異体および *ncbp-2* 変異体における蓄積量は、Col-0 と比較して有意に低下していた ($p<0.001$; 図 2.2b)。

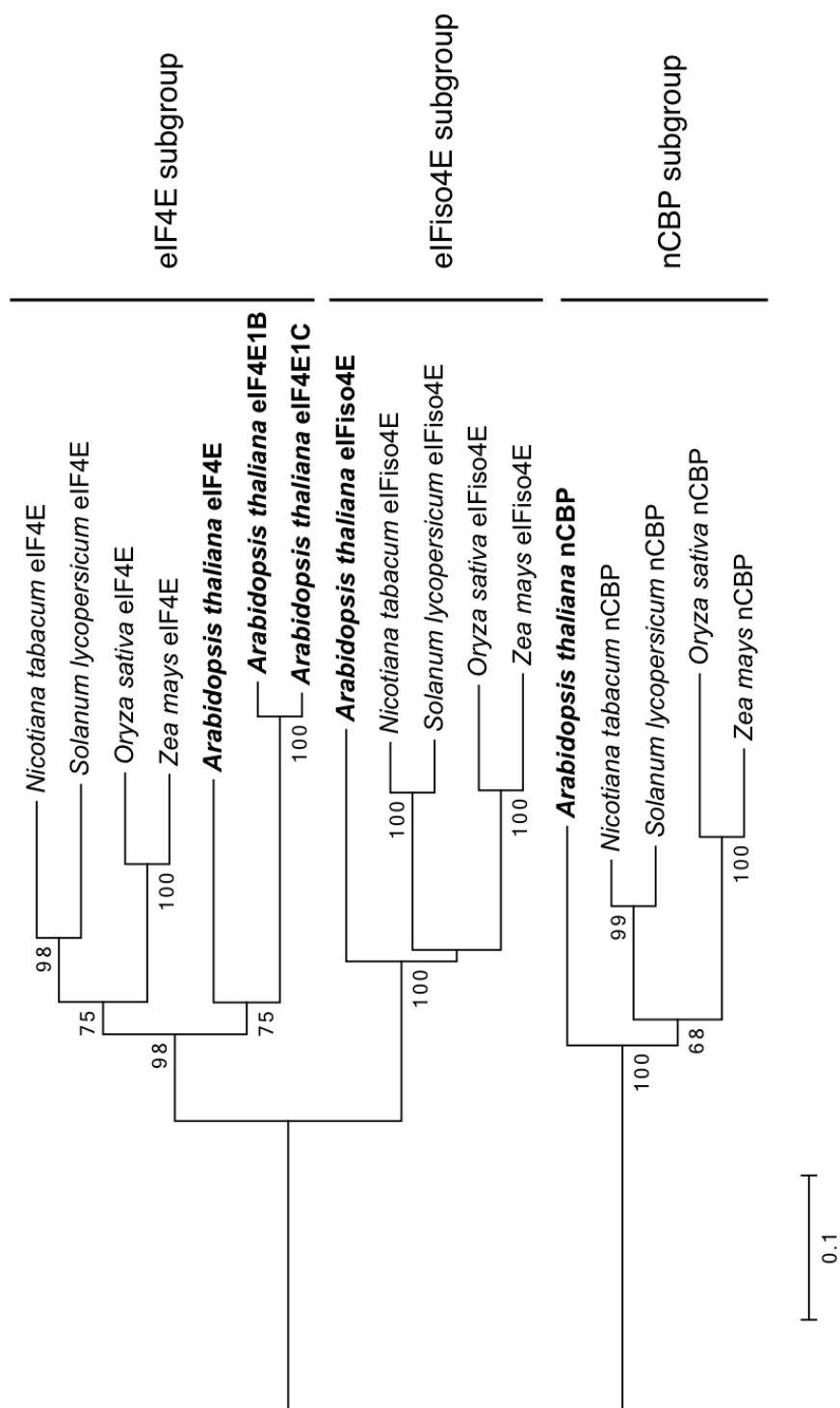
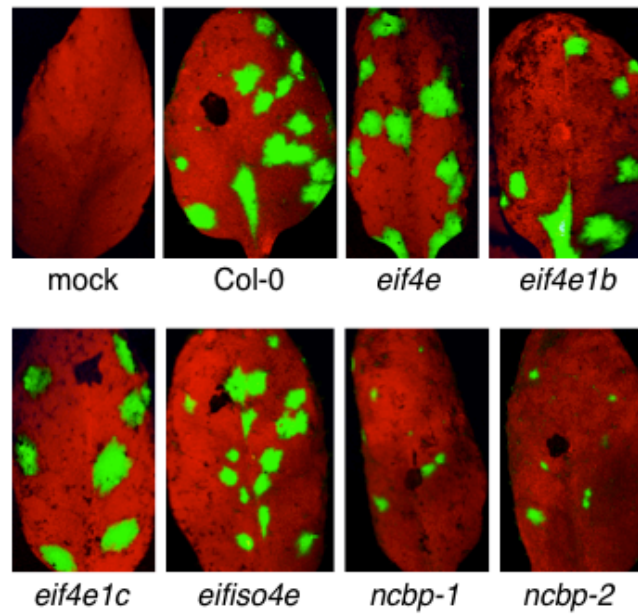


図 2.1 eIF4E アイソフォーム遺伝子の系統解析

eIF4E アイソフォーム遺伝子の配列を用いて作製した系統樹。様々な植物種にコードされる eIF4E アイソフォーム遺伝子の配列を Clustal W によりアライメントした。系統樹は MEGA6 を用いて近隣結合法により作製した。

a



b

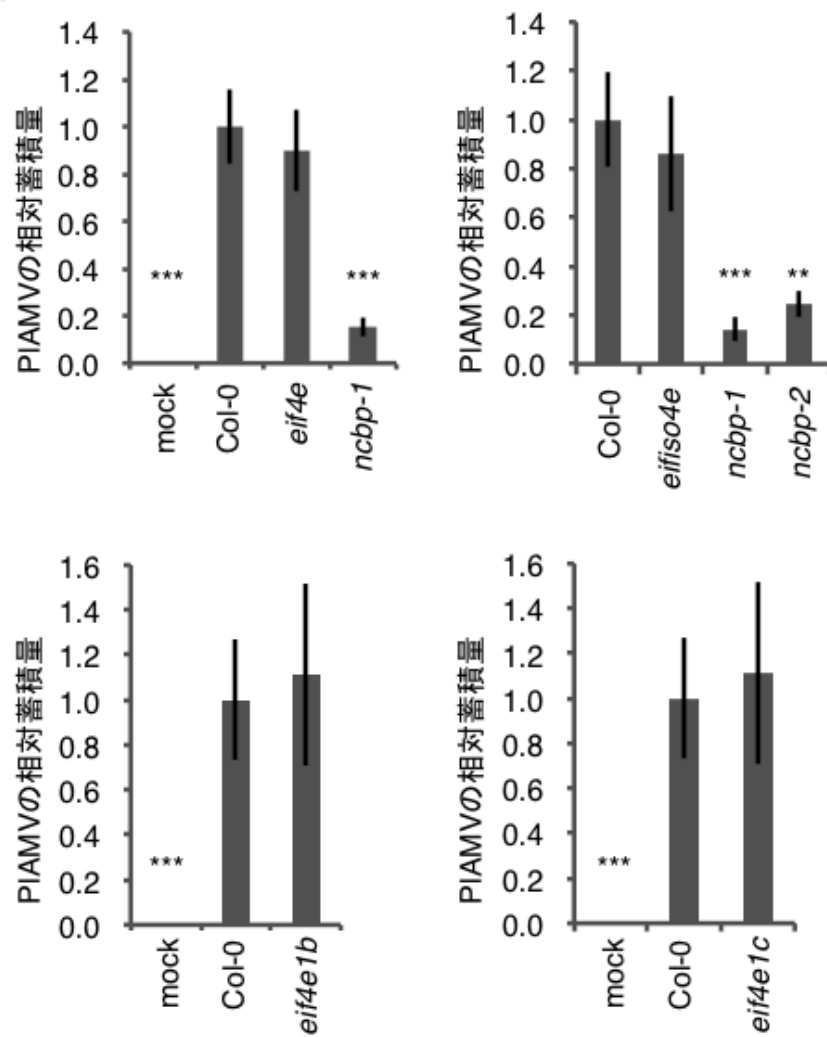


図 2.2 eIF4E アイソフォームを欠損した変異体シロイヌナズナにおける PIAMV-GFP の蓄積量の解析

- a. PIAMV-GFP を接種した接種葉の蛍光観察。変異体および Col-0 に PIAMV-GFP を機械接種法により接種し、接種 4 日後に蛍光実体顕微鏡により接種葉を観察した。
- b. PIAMV-GFP を接種した接種葉における PIAMV-GFP の蓄積量。a. で示した接種 4 日後の接種葉より全 RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法によりウイルス蓄積量を解析した。内部標準遺伝子として *actin* 遺伝子を用いた。各サンプルにおけるウイルス蓄積量を *actin* mRNA の蓄積量で標準化し相対蓄積量を算出した。各変異体におけるウイルス蓄積量を、Col-0 におけるウイルス蓄積量を 1.0 とした相対値として算出した。エラーバーは標準誤差を示す。アスタリスクは Dunnett の多重検定により有意差が認められたことを示す (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$)。



2.3.2. *ncbp* 変異体では PIAMV の全身感染が遅延する

PIAMV が *ncbp* 変異体に全身感染できるか否かを解析するために、*ncbp-1* 変異体および Col-0 に PIAMV-GFP を機械接種した。接種 3 週間後に植物体を観察したところ、Col-0 では上葉および茎で GFP 蛍光が観察され、PIAMV-GFP が全身感染していることが明らかになった。一方、*ncbp-1* 変異体の上葉および茎では、GFP 蛍光は観察されなかった (図 2.4)。

次に、*ncbp* 変異体の上葉に PIAMV-GFP が存在するかどうかを明らかにするために、*ncbp-1* 変異体および *ncbp-2* 変異体、Col-0 に PIAMV-GFP を接種し、接種 3 週間後および接種 4 週間後に上葉より RNA を抽出し RT-PCR によりウイルス RNA の検出を行った。その結果、接種 3 週間後では、Col-0 からはウイルス RNA が検出された。一方 *ncbp-1* 変異体および *ncbp-2* 変異体からは検出されなかった (図 2.5, 表 2.2)。接種 4 週間後では、*ncbp-2* 変異体から PIAMV は検出されず、*ncbp-1* 変異体では 5 個体中 3 個体から PIAMV が検出された (表 2.2)。*ncbp-1* 変異体および Col-0 の上葉における PIAMV の蓄積量を定量 RT-PCR により比較したところ、*ncbp-1* 変異体では蓄積量が低下していることが明らかになった (図 2.6)。これらの結果から、*ncbp* 変異体では PIAMV の全身感染が阻害もしくは遅延することが示された。

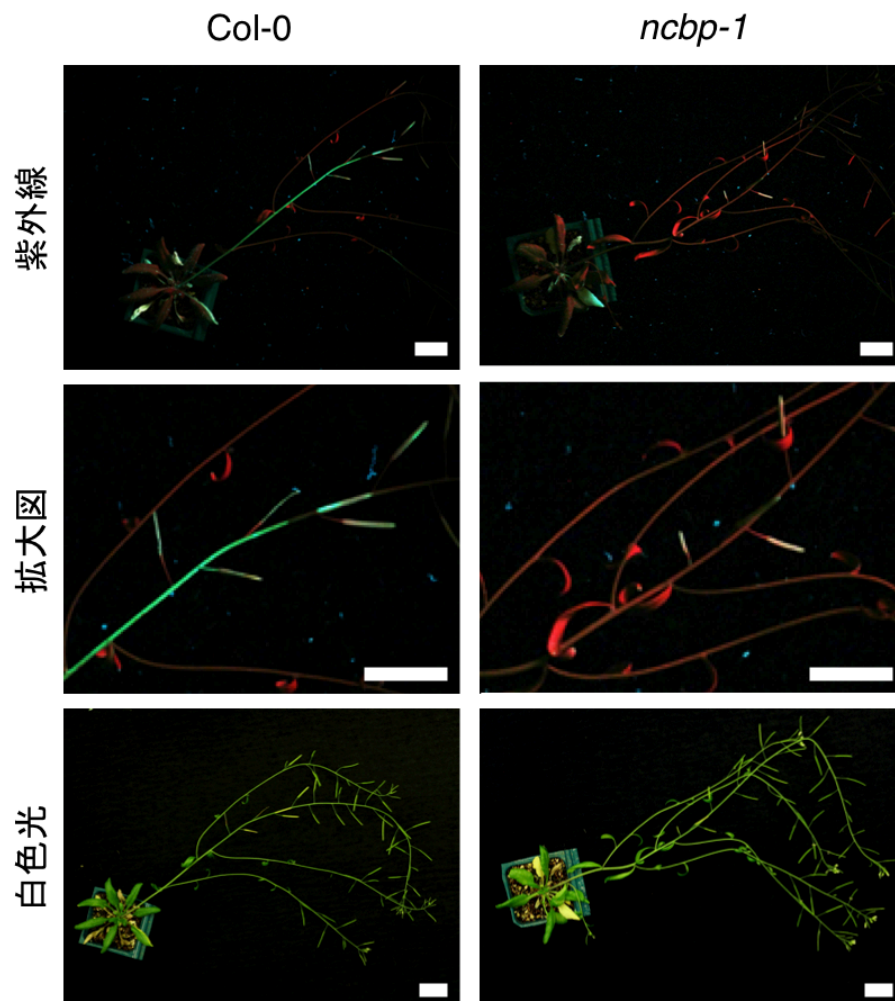


図 2.4 PIAMV-GFP を接種したシロイヌナズナの蛍光写真

ncbp-1 変異体および Col-0 に PIAMV-GFP を機械接種し、接種個体を接種 3 週間後に紫外線照射下で観察した。上および中央の写真は蛍光写真、下の写真は可視光での写真である。中央の写真は上の写真を拡大して表示した。スケールバーは 3.5 cm を示す。

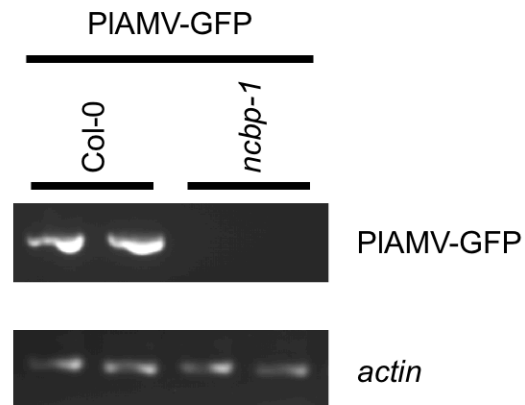


図 2.5 RT-PCR による PIMAV-GFP の検出

ncbp-1 変異体および Col-0 に PIAMV-GFP を機械接種し、接種 3 週間後に上葉より RT-PCR によりウイルス RNA の検出を行った。内部標準として *actin* mRNA を用いた。

表 2.2 *ncbp* 変異体の上葉における PIAMV の検出

	接種 3 週間後			接種 4 週間後		
	検出数 ^a	検体数	割合 (%)	検出数 ^a	検体数	割合 (%)
<i>ncbp-1</i>	0	4	0	3	5	60
<i>ncbp-2</i>	0	6	0	0	6	0
Col-0	4	4	100	3	3	100

a, PIAMV-GFP を *ncbp* 変異体および Col-0 に機械接種し、3 週間後に上葉から抽出した RNA を用いて RT-PCR によりウイルスの検出を行った。数字はウイルスが検出された個体数を示す。

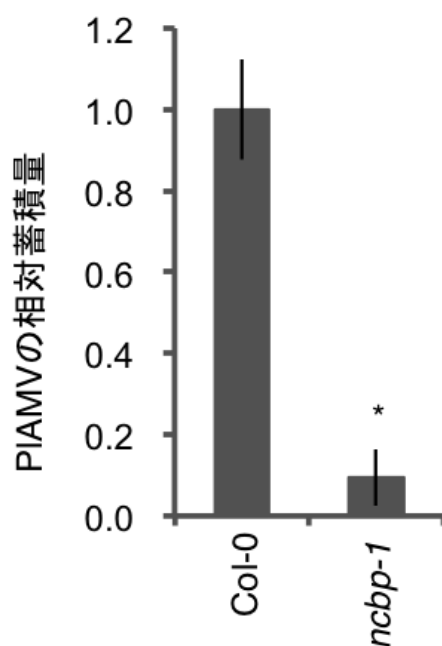


図 2.6 定量 RT-PCR を用いた *ncbp-1* 変異体の上葉におけるウイルス蓄積量の比較

ncbp-1 変異体および Col-0 に PIAMV-GFP を機械接種し、接種 4 週間後に上葉より RNA を抽出し、定量 RT-PCR によりウイルス蓄積量の比較を行った。アスタリスクは Student の t 検定により有意差が認められたことを示す (*, $p < 0.05$)。

2.3.3. *ncbp* 変異体に *nCBP* 遺伝子を相補すると PIAMV の感染性が回復する

ncbp 変異体で PIAMV の蓄積量が減少した原因が *nCBP* の欠損であることを示すために、*ncbp-1* 変異体に *nCBP* 遺伝子を形質転換した相補系統を作出し、接種試験を行った。

相補系統を作出するために、Col-0 より抽出した DNA を鋳型として *nCBP* 遺伝子のプロモーター領域、コード領域、ターミネーター領域を増幅し、バイナリーベクター pFAST01 にクローニングした。得られたプラスミド pF01-*nCBPg* を用いて、フローラルディップ法により *ncbp-1* 変異体に *nCBP* 遺伝子を形質転換した。本章では、得られた相補系統のうち #1A、#3E、#3F を供試した。

得られた相補系統で *nCBP* が発現していることをウエスタンブロット法により確認するために、抗 *nCBP* 抗体の作出を行った。シロイヌナズナの *nCBP* を His-tag との融合タンパク質として大腸菌菌体内で発現させたところ、そのほとんどが不溶性画分で検出された (図 2.7)。そこで、不溶性画分に対して Ni^{2+} カラムを用いたアフィニティー精製により *nCBP* を回収した (図 2.8)。得られた *nCBP* を家兎に免疫し、抗 *nCBP* 抗血清を得た。

ncbp-1 変異体、Col-0、#1A、#3E および #3F より全タンパク質を抽出し、抗 *nCBP* 抗血清を用いたウエスタンブロット解析を行った。その結果、*nCBP* (予想分子量; 25.7kDa) と考えられる特異的なバンドが Col-0、#1A、#3E、#3F で検出され、全ての相補系統で *nCBP* が発現していることが確認された (図 2.9)。

得られた相補系統における PIAMV の感染性を解析するために、*ncbp-1* 変異体、Col-0 および #1A、#3E、#3F に PIAMV-GFP を機械接種し、接種 4 日後に接種葉を観察した。その結果、*ncbp-1* 変異体では Col-0 と比較して蛍光斑の大きさが小さくなっていた一方、#1A、

#3E、#3F では Col-0 と同等の大きさの蛍光斑が観察された (図 2.10a)。PIAMV の蓄積量を定量的に解析するために、接種葉より全 RNA を抽出し定量 RT-PCR を行った。その結果、*ncbp-1* 変異体では Col-0 と比較して有意に蓄積量が低下していたが、#1A、#3E、#3F では Col-0 と同等に PIAMV が蓄積していた (図 2.10b)。

相補系統に PIAMV が全身感染するか否かを明らかにするために、#1A、#3E、#3F および Col-0 に PIAMV-GFP を機械接種し、接種 3 週間後に上葉よりウイルス RNA の検出を試みた。RT-PCR により解析したところ、#1A、#3E、#3F の全ての個体からウイルス RNA が検出された (表 2.3)。以上の結果から、nCBP 相補系統では PIAMV の感染性が回復することが示され、nCBP の欠損によって PIAMV の蓄積量が減少したと考えられた。

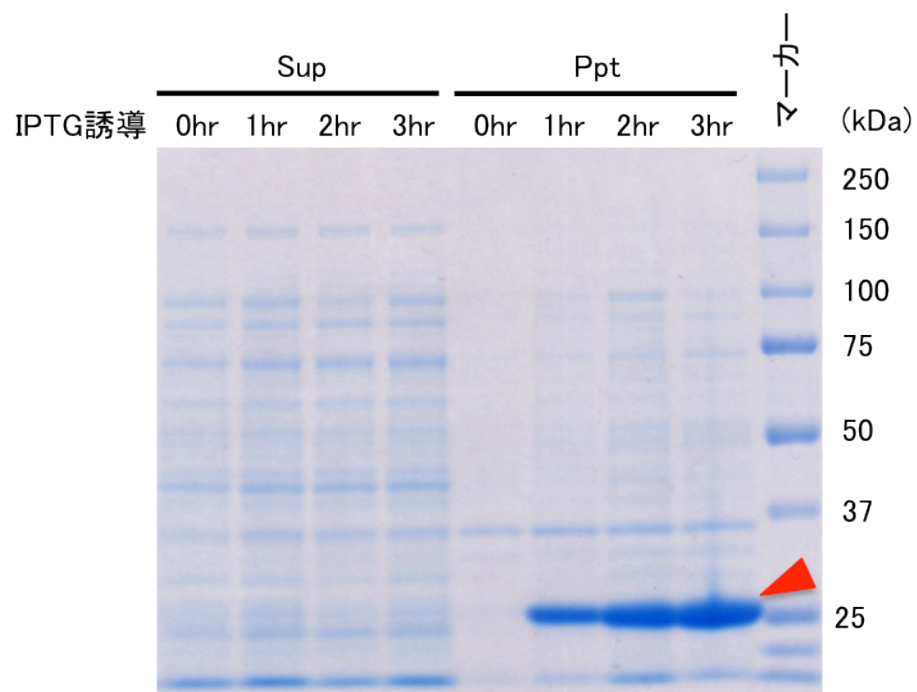


図 2.7 大腸菌における nCBP の発現確認

大腸菌の培養液に IPTG を添加し nCBP の発現を誘導した。IPTG を添加後 0、1、2、3 時間で菌体を回収し、各菌体より調整した可溶性画分 (Sup) および不溶性画分 (Ppt) を SDS-PAGE により分離し、CBB 染色した。矢頭で nCBP の位置を示した。

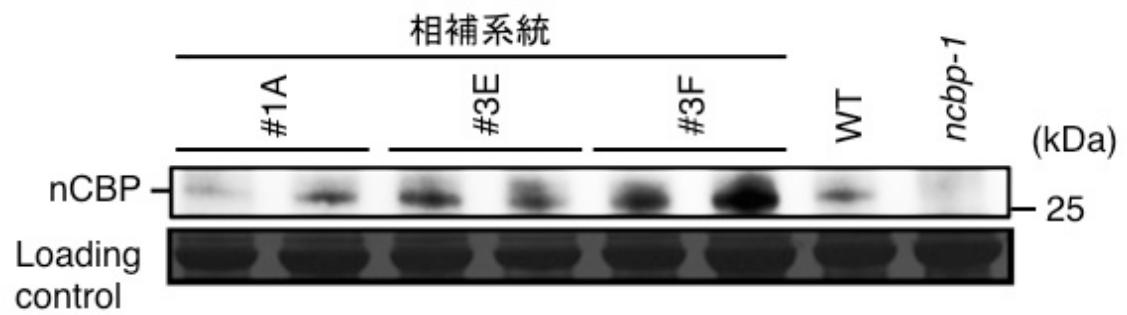


図 2.9 nCBP 相補系統における nCBP の検出

ncbp-1 変異体、#1A、#3E、#3F および Col-0 の展開したロゼット葉より全タンパク質を抽出し、抗 nCBP 抗血清を用いたウェスタンブロット解析を行った。下段に泳動量のコントロールとして全タンパク質の CBB 染色像を示す。

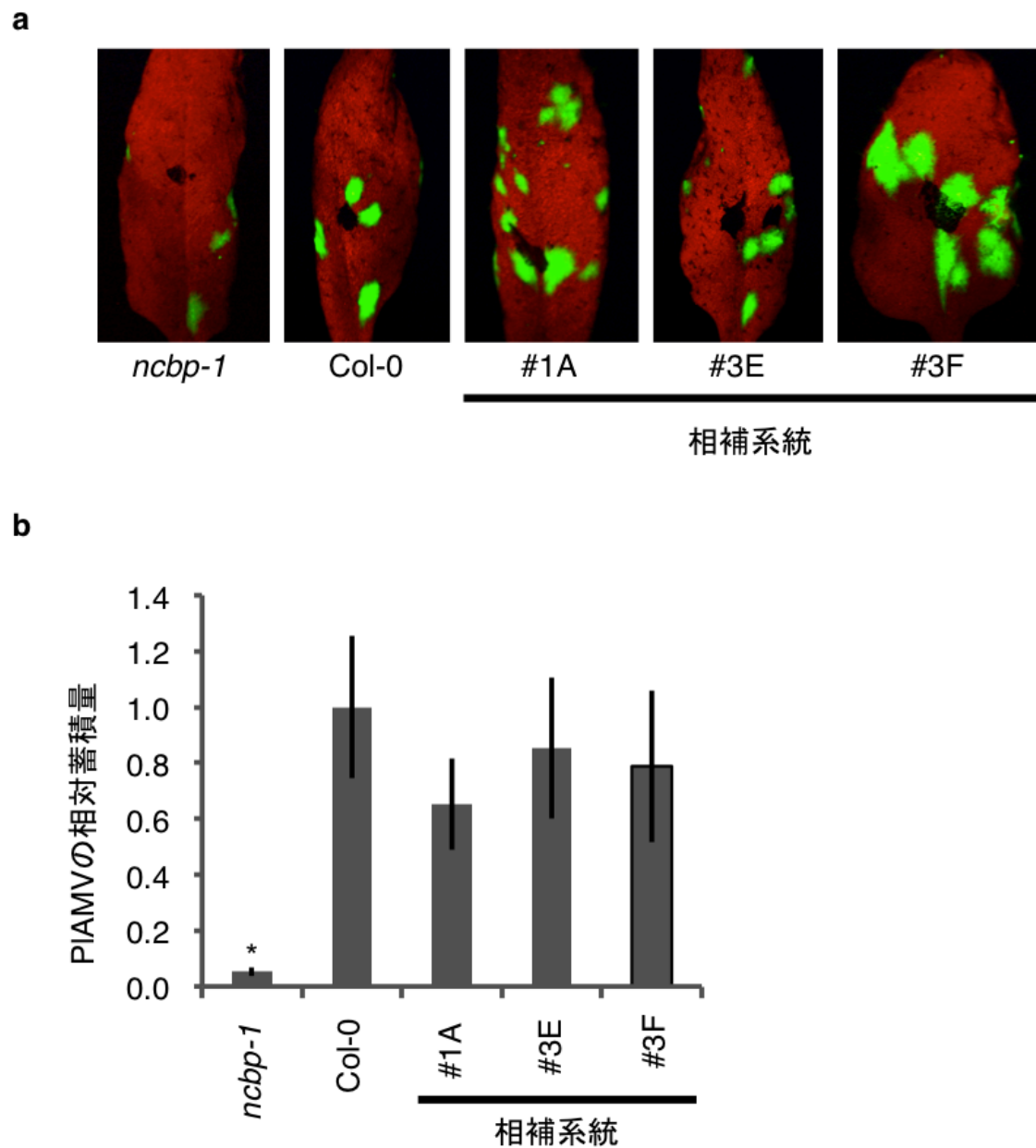


図 2.10 nCBP 相補系統では接種葉における PIAMV の蓄積量が回復する

a. PIAMV-GFP を接種した相補系統の接種葉の蛍光観察。*ncbp-1* 変異体、#1A、#3E、#3F および Col-0 に PIAMV-GFP を機械接種法により接種し、接種 4 日後に蛍光実体顕微鏡により接種葉を観察した。

b. PIAMV-GFP を接種した相補系統の接種葉における PIAMV-GFP の蓄積量。**a.** で示した接種 4 日後の接種葉より全 RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法によりウイルス蓄積量を解析した。内部標準遺伝子として *actin* 遺伝子を用いた。各サンプルにおけるウイルス蓄積量を *actin* mRNA の蓄積量で標準化し相対蓄積量を算出した。各変異体におけるウイルス蓄積量を、

Col-0 におけるウイルス蓄積量を 1.0 とした相対値として算出した。エラーバーは標準誤差を示す。アスタリスクは Dunnett の多重検定により有意差が認められたことを示す (*, $p < 0.05$)。

表 2.3 nCBP 相補系統の上葉における PIAMV の検出

	接種 3 週間後		
	検出数 ^a	検体数	割合 (%)
Col-0	4	4	100
#1A	5	5	100
#3E	5	5	100
#3F	5	5	100

a, PIAMV-GFP を *ncbp* 変異体および Col-0 に機械接種し、3 週間後に上葉から抽出した RNA を用いて RT-PCR によりウイルスの検出を行った。数字はウイルスが検出された個体数を示す。

2.3.4. *ncbp* 変異体では *Alphaflexivirus* 科ウイルスおよび *Betaflexivirus* 科ウイルスの蓄積量が減少する

これまでの解析により、*ncbp* 変異体では PIAMV の蓄積量が低下することが明らかになった。PIAMV の他に nCBP の欠損により蓄積量が低下するウイルスが存在するか否かを検証するため、*ncbp-1* 変異体および Col-0 に複数の植物ウイルスを接種し、その蓄積量を解析した。本章では、*Alphaflexivirus* 科 *Potexvirus* 属に属する AltMV および CymMV、*Alphaflexivirus* 科 *Lolavirus* 属に属する LoLV、*Betaflexivirus* 科 *Carlavirus* 属に属する PVM、*Potyvirus* 科 *Potyvirus* 属に属する TuMV および *Virgavirus* 科 *Tobamovirus* 属に属する YoMV を供試した。これらのウイルスを *ncbp-1* 変異体および Col-0 に機械接種し、接種 4 日後に接種葉におけるウイルスを定量 RT-PCR 法により解析した。その結果、AltMV、CymMV、LoLV および PVM の *ncbp-1* 変異体における蓄積量は Col-0 と比べて有意に低下した (図 2.11)。また、これらのウイルスを nCBP 相補系統#3F に機械接種したところ、その蓄積量は Col-0 と同等まで回復した (図 2.11)。一方、TuMV および YoMV の *ncbp-1* 変異体における蓄積量は Col-0 と同等であった (図 2.11)。以上の結果から、AltMV、CymMV、LoLV および PVM の蓄積量は nCBP の欠損により低下することが明らかになった。

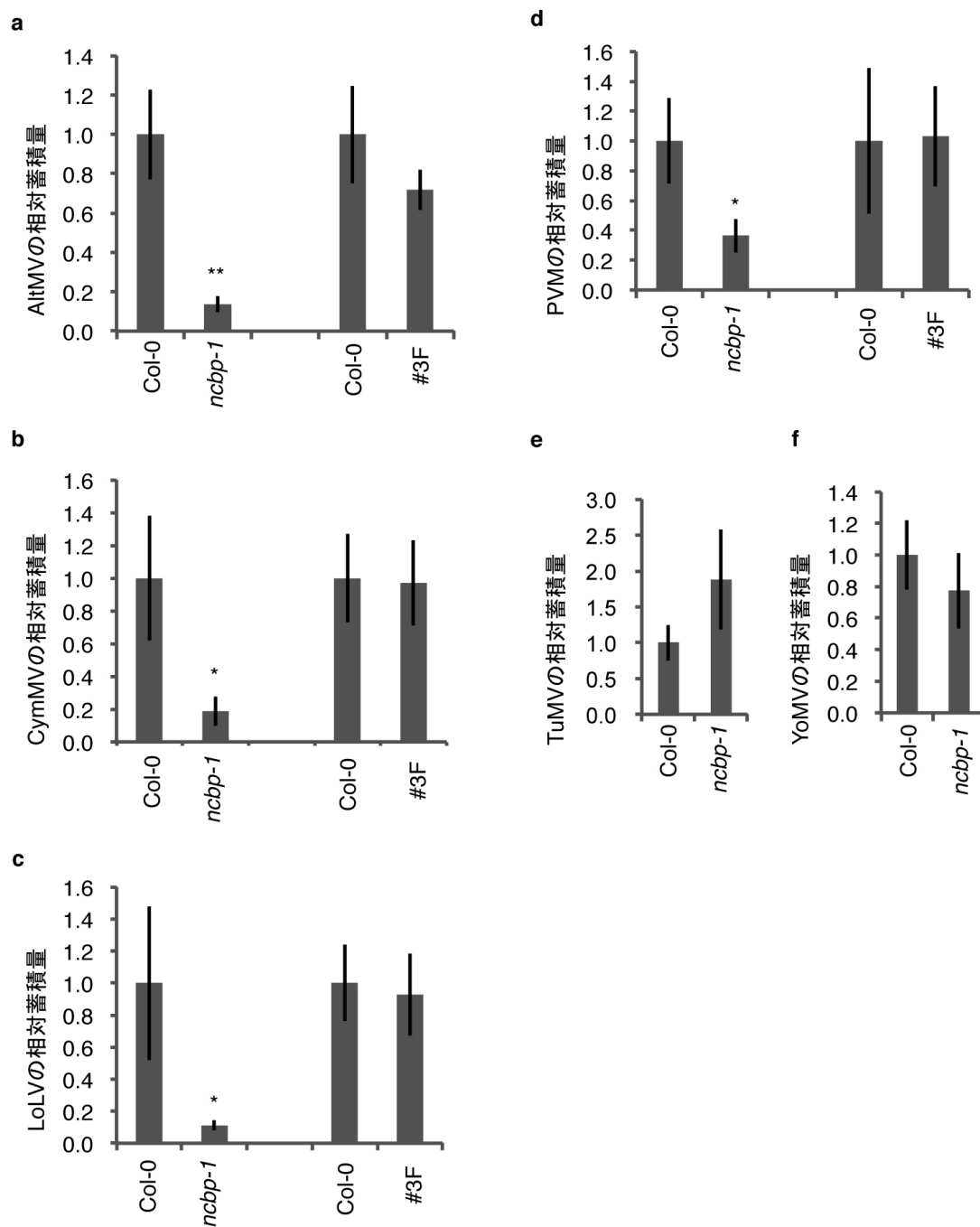


図 2.11 *ncbp* 変異体では *Alphaflexivirus* 科ウイルスおよび *Betaflexivirus* 科ウイルスの蓄積量が低下する

ncbp-1 変異体、相補系統#3F、Col-0 に AltMV (a), CymMV (b), LoLV (c), PVM (d), TuMV (e), and YoMV (f) を機械接種し、接種 4 日後に接種葉より全 RNA を抽出した。各ウイルスの蓄積量を定量 RT-PCR 法により解析した。内部標準遺伝子として *actin* 遺伝子を用いた。各サンプルにおけるウイルス蓄積量を *actin* mRNA の蓄積量で標準化し相対蓄積量を算出した。*ncbp-1* 変異体および相補系統#3F におけるウイルス蓄積量を、Col-0 におけるウイルス

蓄積量を 1.0 とした相対値として算出した。エラーバーは標準誤差を示す。アスタリスクは Student の t 検定により有意差が認められたことを示す (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$)。

2.4. 考察

2.4.1. *ncbp* 変異体では PIAMV の蓄積量が低下する

植物には 3 種類の eIF4E アイソフォーム (eIF4E、eIFiso4E、nCBP) がコードされる (Joshi et al., 2005)。これらの eIF4E アイソフォームのうち、eIF4E および eIFiso4E は植物ウイルスに対する劣性抵抗性に関わることが報告されている (表 1.1)。実際、eIF4E を欠損した植物は *Potyvirus* 属ウイルス、*Bymovirus* 属ウイルス、*Cucumovirus* 属ウイルス、*Carmovirus* 属ウイルスに対して抵抗性を示し (Diaz et al., 2004; Yohii et al., 2004; Kang et al., 2005a; Kanyuka et al., 2005; Stein et al., 2005; Nieto et al., 2006)、eIFiso4E を欠損した植物は *Potyvirus* 属ウイルスに抵抗性となる (Lellis et al., 2002; Nicaise et al., 2007)。しかしながら、*Potexvirus* 属ウイルスについては、eIF4E アイソフォームの欠損により感染が阻害されるか否かは明らかでなかった。

本章では、eIF4E アイソフォームのいずれかを欠損した変異体シロイヌナズナに PIAMV を接種しその蓄積量を評価した。その結果、eIF4E、eIF4E1b、eIF4E1c、eIFiso4E のいずれかを欠損した変異体における PIAMV の蓄積量は野生型シロイヌナズナと同程度であった (図 2.2)。対照的に、nCBP を欠損した変異体では PIAMV の蓄積量が野生型シロイヌナズナと比べて有意に低下した (図 2.2)。そこで、PIAMV の蓄積量の低下が nCBP の欠損に起因することを示すために、*ncbp* 変異体に *nCBP* 遺伝子を形質転換した相補ラインを作出し、PIAMV の接種試験を行った。その結果、解析に供試した全ての相補系統において PIAMV の蓄積量が回復し (図 2.10)、nCBP の欠損により PIAMV の蓄積量が低下することが示された。したがって、nCBP は PIAMV の感染に寄与すると考えられた。本章での結果から、eIF4E および eIFiso4E に加え、nCBP も植物ウイルスの感染に関わることが初めて明らかになった。

2.4.2. PIAMV の感染における nCBP の役割

本章での解析の結果、*ncbp* 変異体では PIAMV の蓄積量が低下し、nCBP が PIAMV の感染に関わることが示された。nCBP の機能としては、以下の 2 つの仮説が考えられる。① nCBP は PIAMV が利用する宿主因子である可能性、② nCBP は HR のネガティブレギュレーターである可能性である。序論で述べたように、HR は細胞死を伴う強い抵抗性であり、その誘導には負の制御がなされている。したがって、負の制御に関わる因子が欠損した変異体では常時抵抗性反応が誘導される。例えば、HR の負の制御因子を欠損した変異体シロイヌナズナでは、恒常的に細胞死が誘導され (Rate et al., 1999; 図 2.12)、非特異的に様々な病原体の感染が阻害される (Greenberg and Ausubel, 1993)。

eIF4E アイソフォームのうち、eIF4E については植物ウイルスの感染における分子機能が明らかにされつつある。シロイヌナズナの eIF4E は CMV の移行タンパク質の翻訳に、メロンの eIF4E は MNSV のウイルスタンパク質の翻訳に関与する (Yoshii et al., 2008; Truniger et al., 2008)。MNSV の例においては、eIF4E が eIF4G とともに MNSV のウイルス RNA 上の高次構造に結合し、ウイルスタンパク質の翻訳に必須な役割を果たす (Miras et al., 2016)。これらの知見をふまえると、*ncbp* 変異体で観察された抵抗性の原因として、②の nCBP が HR のネガティブレギュレーターである可能性は排除されないものの、①のウイルスの感染に関わる宿主因子が欠損したことに起因する可能性が考えられた。この場合、*Alphaflexivirus* 科および *Betaflexivirus* 科ウイルスは nCBP を利用してシロイヌナズナに感染していると推察される。

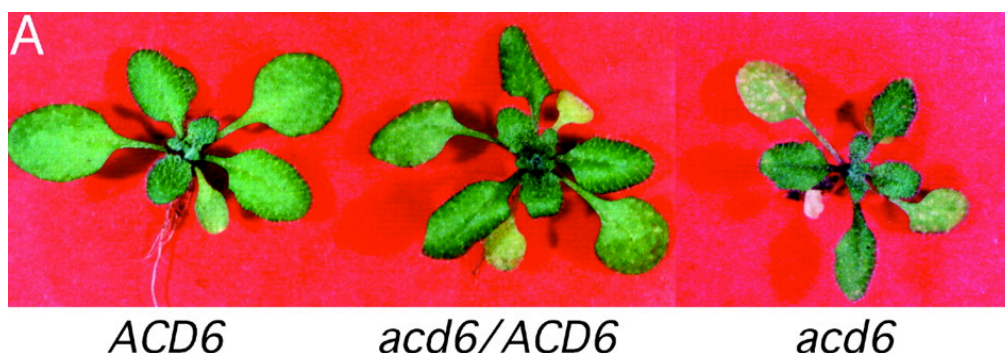


図 2.12 HR の負の制御因子 (ACD6) を欠損した変異体シロイヌナズナでは細胞死が恒常的に誘導される (Rate et al., 1999)

左から、野生型シロイヌナズナ (*ACD6*)、*ACD6* をヘテロで持つ変異体シロイヌナズナ (*acd6/ACD6*)、*ACD6* をホモで欠損した変異体シロイヌナズナ (*acd6*) の写真を示す。

2.4.3. PIAMV の感染への eIF4E および eIFiso4E の関与

PIAMV は nCBP を利用して感染することが示唆されたが、PIAMV が eIF4E または eIFiso4E を利用している可能性はないのだろうか。これまでに、植物ウイルスが複数の植物因子を機能的に重複して利用する例が報告されている (Nishikiori et al., 2011; Nicaise et al., 2007)。例えば、*Potyvirus* 属ウイルスである TuMV はシロイヌナズナに感染する際に eIFiso4G1 および eIFiso4G2 を重複して利用する (Nicaise et al., 2007)。eIFiso4G1 または eIFiso4G2 のいずれかを欠損した変異体シロイヌナズナに TuMV は感染することができるが、二重変異体には感染できない (Nicaise et al., 2007)。同様に、本論文においても eIF4E および eIFiso4E が PIAMV の感染に関わるが機能的に重複しているために、*eif4e* 変異体および *eifiso4e* 変異体で抵抗性が観察されなかった可能性が考えられる。さらに、*ncbp* 変異体に PIAMV が遅延しつつも全身感染した結果から (表 2.2)、eIF4E または eIFiso4E が nCBP の代替の因子として機能した可能性も考えられる。これらの仮説を検証するためには、

eIF4E、eIFiso4E、nCBP の多重変異体を用いた解析が必須である。これまでに eIF4E および eIFiso4E の二重変異体は致死であることが示唆されており (Patric et al., 2014)、上述の多重変異体でも同様のことが生じる可能性がある。さらなる解析には RNA サイレンシングなどの発現抑制系が有用だろう。

2.4.4. nCBP は *Alphaflexivirus* 科ウイルスおよび *Betaflexivirus* 科ウイルスの感染に関わる

本章では、nCBP を利用する植物ウイルスの広域性を明らかにする目的で、*ncbp* 変異体に多様な植物ウイルスを接種し蓄積量を解析した。その結果、*Alphaflexivirus* 科 *Potexvirus* 属に属する AltMV および CymMV、*Alphaflexivirus* 科 *Lolavirus* 属に属する LoLV、*Betaflexivirus* 科 *Carlavirus* 属に属する PVM の蓄積量が変異体で有意に低下した (図 2.11)。さらに、nCBP 相補系統ではこれらのウイルスの蓄積量が回復した (図 2.11)。これらの結果から、*Alphaflexivirus* 科および *Betaflexivirus* 科に属する植物ウイルスが nCBP を利用していることが示唆された。しかしながら、*Potyvirus* 科 *Potyvirus* 属に属する TuMV および *Virgavirus* 科 *Tobamovirus* 属に属する YoMV の蓄積量は変異体と野生型植物で同等であったことから (図 2.11)、これらのウイルスは nCBP を特異的に利用していないと考えられた。

以上を要するに、本章での解析により、*ncbp* 変異体では *Alphaflexivirus* 科および *Betaflexivirus* 科に属する植物ウイルスの感染が阻害されることが明らかになった。そこで次章では、これらの植物ウイルスの感染における nCBP の役割を明らかにするため、PIAMV をモデルとして用いてさらなる解析を行った。

第3章 nCBPの欠損によるポテックスウイルスの感染 障害機構の解析

3.1. 序文

第2章の解析の結果、nCBPの欠損によって *Alphaflexivirus* 科および *Betaflexivirus* 科ウイルスの蓄積量が低下することが示された。これらの結果を受けて、本章ではモデルウイルスとして *Alphaflexivirus* 科 *Potexvirus* 属に属する PIAMV を用い、PIAMV の感染における nCBP の機能について明らかにすることを目的とした。そこで本章の序文では、*Potexvirus* 属ウイルスの感染過程について概説する。1.2.2.項の通り、*Potexvirus* 属ウイルスは3つの段階を経て植物体に全身感染する。

細胞内での増殖

植物細胞に侵入した *Potexvirus* 属ウイルスは、脱外被によりゲノム RNA を露出させる。細胞質に露出したゲノム RNA を鋳型として RdRp が翻訳される。*Potexvirus* 属ウイルスの複製に必須なウイルスタンパク質は RdRp のみであることが明らかになっている (Komatsu et al., 2011)。次いで、翻訳された RdRp がゲノム RNA を鋳型として複製反応を開始する。まず、ゲノム RNA の相補鎖であるマイナス鎖が、次いでマイナス鎖を鋳型としてプラス鎖が合成される。マイナス鎖からはゲノム RNA に加え、サブゲノム RNA1、サブゲノム RNA2、サブゲノム RNA3 も合成される (Verchot et al., 1998; Verchot-Lubicz et al., 2007; 図 3.1)。サブゲノム RNA1 からは TGB1 が、サブゲノム RNA2 からは TGB2 および TGB3 が、サブゲノム RNA3 からは CP が翻訳される (Verchot et al., 1998; Verchot-Lubicz

et al., 2007; 図 3.1)。

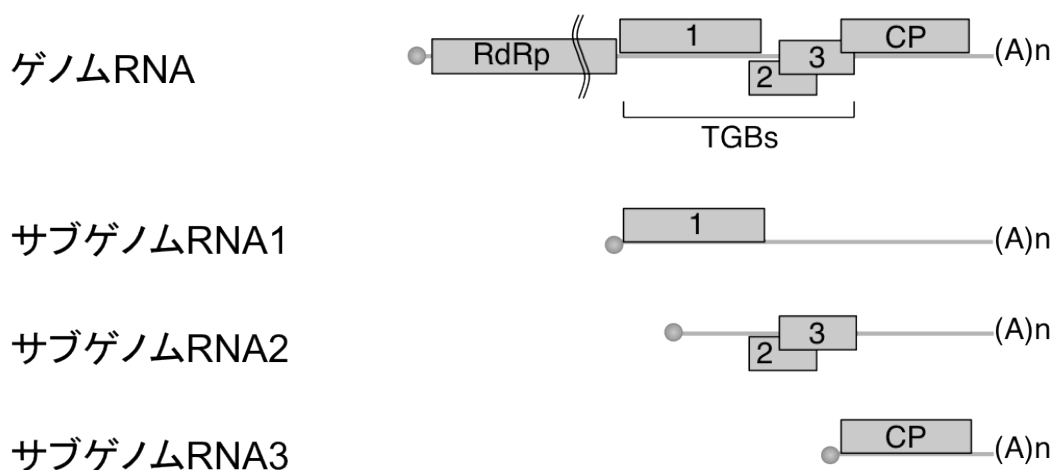


図 3.1 ポテックスウイルスの遺伝子発現機構

Potexvirus 属のタイプ種である PVX を用いて作出した。灰色の円はキャップ構造を、線はウイルス RNA を、四角は ORF を示す。サブゲノム RNA 上の ORF は、当該サブゲノム RNA から翻訳されるもののみを示した。PVX が感染した細胞では、2.1kb のサブゲノム RNA1、1.4kb のサブゲノム RNA2、0.9kb のサブゲノム RNA3 が蓄積することが示されている (Verchot et al., 1998)。

細胞間移行

侵入細胞で増殖した *Potexvirus* 属ウイルスのゲノム RNA は TGB1、TGB2、TGB3、CP の機能によって PD へと運ばれ、隣接細胞へ移行する (Verchot-Lubicz et al., 2007)。これらのいずれのウイルスタンパク質が欠損してもウイルスは細胞間移行することができないと考えられている (Ozeki et al., 2009; Tilsner et al., 2013)。

長距離移行

篩部細胞へと侵入した *Potexvirus* 属ウイルスは篩管流の流れを利用し、長距離移行する。

Potexvirus 属ウイルスの長距離移行は、複製複合体 (VRC) の形態でなされと考えられている (Wan et al., 2015)。

第2章の解析の結果、nCBP の欠損によって PIAMV の接種葉における蓄積量が低下した。

この結果から、nCBP は PIAMV の細胞内での増殖もしくは細胞間移行に関わる可能性が考えられた。このような背景のもと、本章では *ncbp* 変異体における PIAMV の挙動を解析した。

3.2. 材料および方法

3.2.1. 供試植物

本章では *A. thaliana* は野生型エコタイプ Columbia (Col-0) に加え、*ncbp-1* 変異体、*ncbp-2* 変異体、nCBP 相補ライン#1A、#3E、#3F を供試した。これらの植物については 2.2.2.項および 2.2.12.項を参照のこと。

3.2.2. 供試ウイルス

本章では PIAMV Pr 分離株を供試した。本分離株については 2.2.3.項を参照のこと。

3.2.3. プラスミドの構築

ノーザンブロット解析 (3.2.8.項) で使用するプローブを転写するために、ウイルスの部分領域をクローニングした。まず、pCAM-Pr を鋳型にプライマー Pr-5101F/ Pr-6102R を用いて PCR 増幅した。PCR の増幅酵素としては増幅産物が平滑末端となる KOD-PLUS (TOYOBO) を使用した。本章で使用したプライマーの配列は 3.2.項の最後にまとめた。増幅産物を電気泳動により分離し、予想分子量に相当するバンドを含むゲルを切り出した。ゲル片から、illustra GFX PCR Purification Kit (GE Healthcare) を用いて DNA を回収した。回収した DNA 溶液を Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてクローニングした。クローニング産物を大腸菌 DH5 α に形質転換した。大腸菌を、選抜マーカーとして kanamycin を含む LB 固形培地に塗布し、37°C で一晚培養した。形成されたコロニーを LB 液体培地 (kanamycin を含む) に移し、適度に濁るまで 37°C で震盪培養した。増殖した大腸菌から DNA 自動分離装置 GENE PREP STAR PI-480 (クラボウ) を用いて DNA を抽出した。2.2.5.項と同様にシーケンス解析を行い、インサートがどの向きで挿入されているかを調べた。T7 プロモーターを用いて転写した際に、プラス鎖検出用のプローブが転写されるクローンを pCR-Pr-2、マイナス鎖検出用のプローブが転写されるクローンを pCR-Pr-1 とした。なお、プローブの転写については 3.2.8.項で述べる。

3.2.4. パーティクルガンによるウイルス接種

ncbp 変異体におけるウイルスの広がりを定量的に解析するために、パーティクルガン法

によりウイルス接種を行った。実験手順は、Hagiwara らの報告 (2003) を参考にした。

金粒子の調製

0.6 μm 径の金粒子 (0.6 μm Gold Microcarriers, Bio-Rad) 15 mg をエッペンチューブにはかり取った。エッペンチューブに 70%エタノールを加え、超音波破碎 (Branson Sonifier, Emerson)、出力 20%、20 秒の条件) した。エッペンチューブを VORTEX により激しく攪拌し、再度超音波破碎した。この作業をだまがなくなるまで繰り返した。15 分間室温で静置し、卓上遠心機で遠心し金粒子を沈殿させた。上清を除き、DW を 1 ml 加えた。1 分間 VORTEX で激しく攪拌し、1 分間静置し、卓上遠心機で遠心し金粒子を沈殿させた。上記の洗浄を合計 3 回繰り返した。上清を除いた後、500 μl の 50%(v/v) glycerol を加え、4°C で保存した。

プラスミド DNA の金粒子への吸着

調製した金粒子 10 μl をエッペンチューブに入れ、プラスミド DNA を 1 μg 加え、VORTEX により激しく攪拌した。エッペンチューブに 2.5 M CaCl_2 を 10 μl 、0.1 M スペルミジンを 4 μl 加え、VORTEX により激しく攪拌した。エッペンチューブに 20 μl の 100%エタノールを加え、VORTEX により激しく攪拌した。エッペンチューブを-30°C で 30 分以上静置した。

植物体へのプラスミド導入

前項目で調製したエッペンチューブを卓上遠心機で遠心し、上清を除いた。50 μl の 100%エタノールを加え、ピペティングにより沈殿を懸濁させた。エッペンチューブを卓上遠心機で遠心し、上清を除いた。上記の洗浄を合計 3 回繰り返した。上清を除いた後、12 μl の 100%エタノールに懸濁させた。マクロキャリアー (165-2335, Bio-Rad) をキャリアホルダーにはめ、中心に調製した金粒子を広げた。Biolistic PDS 1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad) を用いて植物体に遺伝子を導入した。なお、圧力は 650 psi で行った。23°C で植物体を維持し、接種 12 時間後、24 時間後、36 時間後で観察を行った。

3.2.5. プロトプラストへのプラスミド導入

シロイヌナズナの展開葉からのプロトプラストの単離およびプラスミドの導入は Jin らの報告 (2001) をもとに行った。以下に具体的な手順を述べる。

プロトプラストの単離

メス替え刃 (2-5745-14 No. 23, AS ONE) を用いて *A. thaliana* の展開葉を短冊上状に刻み、酵素液 (1%(w/v) Cellulase R-10 (Onozuka)、0.25%(w/v) Macerozyme R-10 (Onozuka)、0.4 M mannitol、8 mM CaCl_2 、5 mM MES、pH 5.6) 50 ml が入った 100 ml フラスコに入れた。この際、*A. thaliana* の葉が乾かないうちに手際よく酵素液に浸すことがプロトプラストを単離する上で重要であった。刻みはペーパータオル上で行うと作業がしやすかった。刻んだ葉の量が 5 g になったら、アルミホイルでふたをし、23°C、60 rpm、3 時間震盪した。震盪後のプロトプラストを含む処理液を 106 μm 径のメッシュで濾過し、夾雑物を除いた。濾過した液を 50 ml ファルコンチューブに移し、50×g、23°C、5 分の条件で遠心し、プロトプラストを回収した。減速は最大限低速で行った。上清を除き、50 ml の W5 洗浄バッファー (154 mM NaCl, 125 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 mM KCl, 5 mM glucose, 1.5 mM MES, 0.1 M mannitol, pH 5.6) を加え、穏やかに沈殿を懸濁させた。50×g、23°C、5 分の条件で遠心し、プロトプラストを沈殿させた。なお、減速は最大限低速で行った。上清を除き、10 ml の W5 洗浄バッファーを加え、穏やかに沈殿を懸濁させた。懸濁液を 20 ml の 21%(w/v) sucrose の上に重層し、80×g、23°C、10 分の条件で遠心した。なお、減速は最大限低速で行った。21%(w/v) sucrose の上のプロトプラスト層を回収し、20 ml の W5 洗浄バッファーが入った新しい 50 ml ファルコンチューブに入れた。穏やかに転倒混和し、60×g、23°C、5 分の条件で遠心し、プロトプラストを沈殿させた。なお、減速は最大限低速で行った。上清を除き、30 ml の W5 洗浄バッファーを加え、穏やかに沈殿を懸濁させた。50×g、23°C、5 分の条件で遠心し、プロトプラストを沈殿させた。なお、減速は最大限低速で行った。上清を除き、10 ml の W5 洗浄バッファーを加え、穏やかに沈殿を懸濁させた後、氷上で 30 分間静置した。

プロトプラストへのプラスミド導入

単離されたプロトプラストの数を血球計算版を用いて計測した。50×g、4°C、5 分の条件で遠心し、プロトプラストを沈殿させた。なお、減速は最大限低速で行った。上清を除き、プロトプラストが 5.0×10^6 個/ml の濃度になるように MaMg バッファー (400 mM mannitol, 15 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 mM MES, pH 5.6) を加え、穏やかに沈殿を懸濁させた。導入するプラスミド 100 μg をラウンドチューブ (35-2059, BD FALCON) に分注し、プロトプラスト液 300 μl 加え、軽く混ぜた。PEG バッファー (40%(w/v) PEG 4000、0.4 M mannitol、100 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) を 300 μl 加え、素早く混和し、30 分常温で静置した。W5 洗浄バッファーを 10 ml 加え、穏やかに混和した。50×g、23°C、5 分の条件で遠心し、プロトプラストを沈殿させた。なお、減速は最大限低速で行った。上清を除き、W5 洗浄バッファーを 500 μl に穏やかに懸濁させ、24 穴マルチウェルプレート (35-3047, BD FALCON)

に分注した。23°C で 1-3 日間維持した。

3.2.6. プロトプラストからの RNA 抽出、DNase 処理、逆転写反応

プロトプラストからの RNA 抽出は RNA 抽出用試薬セパゾール (ナカライテスク) を用いて行った。

プロトプラストをエッペンチューブに回収し、100×g、4°C、5 分の条件で遠心してプロトプラストを回収した。回収したエッペンチューブを液体窒素中で瞬間凍結させた。凍結したプロトプラストが溶ける前にセパゾールを 1 ml 加え、ピペッティングにより丁寧に混和した。200 µl のクロロホルムを加え、転倒混和し、5 分間静置した。21,500×g、25°C、5 分の条件で遠心した。上清を回収し、あらかじめイソプロパノールを 500 µl 分注したエッペンチューブに入れた。丁寧に転倒混和し、21,500×g、25°C、30 分の条件で遠心した。上清を除き、70%エタノールを 1 ml 加え、転倒混和し、21,500×g、25°C、3 分の条件で遠心した。上清を除き、もう一度洗浄を繰り返した。上清を除き、自然乾燥によりエタノールを蒸発させた。20 µl の DW に溶解し、ナノドロップにより収量を確認した。

DNase 処理および逆転写反応は、2.2.8.項と同様に行った。

3.2.7. 定量 RT-PCR 解析

定量 RT-PCR 解析は 2.2.8.項と同様に行った。本章では、PIAMV の蓄積量を解析するために Plrep3F/Plrep3R、外部標準として GFP mRNA の蓄積量を解析するために sGFP-379F/sGFP-486R を用いた。これらのプライマーの配列は 3.2.項の最後にまとめた。

3.2.8. ノーザンブロット解析

PIAMV のゲノム RNA、サブゲノム RNA、マイナス鎖 RNA を検出するために、ノーザンブロット解析を行った。RNA 抽出は 2.2.7.項と同様に行った。解析にあたっては、1 サンプルあたり 1 µg の抽出 RNA を使用した。

泳動

全 RNA (DNase 処理なし) に 1.5×dye (50%(v/v) 脱イオン化ホルムアルデヒド, 6%(v/v) ホルムアルデヒド, 1×MOPS バッファー (20 mM MOPS, 5 mM CH₃COONa, 2 mM EDTA,

pH 7.0), 10%(v/v) グリセロール, 0.5%(w/v) BPB) を加え 65°C で 10 分間変性処理し、ホルムアルデヒド変性アガロースゲル (1%(w/v) アガロース, 1×MOPS バッファー, 5%(v/v) ホルムアルデヒド, 0.01%(v/v) 臭化エチジウム) で電気泳動することにより分離した。泳動バッファーとしては 1×MOPS バッファーを用いた。泳動したゲルを紫外線照射下でリボソーム RNA を観察し、各サンプル間で RNA 量が揃っていることを確認した。ゲルを 10×SSC バッファー (1.5 M NaCl, 150 mM C₆H₅Na₃O₇·2H₂O, pH 7.4) で 10 分間洗浄した。

転写

Turboblotter system (Schleicher & Schuell) を用いて RNA を Nyron Membrane positively charged (Roche Diagnostics) に転写した。具体的には、Stack Tray の上にペーパータオル、ろ紙 4 枚、10×SSC バッファーに浸したろ紙 1 枚、メンブレン、泳動したゲル、10×SSC バッファーに浸したろ紙 3 枚を載せた。続いて、Buffer Tray をセットし、10×SSC バッファーで満たした。最後に Buffer Wick および Wick Cover を載せた。この状態で 8 時間以上静置した。メンブレンを 2×SSC バッファーで洗浄した。1,200 × 100 μJ/cm²、3 分間の条件で紫外線を照射し、UV クロスリンクによって RNA をメンブレンに固定した。

ハイブリダイゼーション

ハイブリバック (ハイブリ・バック・ハード; コスモバイオ) にメンブレンと 68°C に温めた Hybridization Buffer (Roche Diagnostics) を 14 ml 入れて密封し、68°C で 4 時間プレハイブリダイゼーションを行った。プローブ液 (Hybridization Buffer 1 ml に調製したプローブ (プローブの調整方法は 3.2.8. 項の最後に記載した) を 300 ng (終濃度 20 ng/ml) 加えたもの) を 68°C で 10 分間静置した。ハイブリバックにプローブ液を 1 ml 加え、68°C で 1 晩ハイブリダイズさせた。

検出

ハイブリダイズさせたメンブレンを Wash Buffer 1 (2×SSC, 0.1%(w/v) SDS) に浸して 5 分間震盪した。Wash Buffer 1 をすて、もう一度洗浄を繰り返した。メンブレンを Wash Buffer 2 (0.2×SSC, 0.1%(w/v) SDS) に浸して 68°C で 20 分間震盪した。Wash Buffer 2 をすて、もう一度洗浄を繰り返した。メンブレンを Washing Buffer (Roche Diagnostics) に浸し、5 分間震盪した。Washing Buffer による洗浄を 2 回繰り返した。メンブレンを Blocking Buffer (Roche Diagnostics) に浸し、30 分間震盪した。Anti-Digoxigenin-Fab fragment 抗体 (Roche Diagnostics) を Blocking Buffer で 10,000 倍希釈した。この希釈液にメンブレンを浸し、30 分間震盪した。Washing Buffer にメンブレンを浸し、15 分間震盪した。Washing

Buffer による洗浄を 2 回繰り返した。Detection Buffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 9.5) にメンブレンを浸し、5 分間震盪した。化学発光試薬 CDP-star (New England Biolabs) 10 μ l、25 \times CDP-star dilution buffer (New England Biolabs) 40 μ l、DW 950 μ l をエッペンチューブ内で混和し、21,500 \times g、5 分の条件で遠心した。メンブレンに 12. で作製した CDP-star 液を滴下し、LAS-4000 mini (FUJIFILM) で検出を行った。

プローブの調製

ノーザンブロット解析でウイルス RNA を検出するため、DIG ラベルされたハイブリダイゼーション用プローブを作製した。

pCR-Pr-1 および pCR-Pr-2 (作製方法は 3.2.3. 項を参照) を制限酵素 *Bam*HI で処理し、直鎖化した。以下の反応液を調製し、37 $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた。なお、試薬は DIG RNA labeling mix (Roche Diagnostics) を使用した。

鋳型 DNA	1 μ g
10 \times NTP labeling mix	2 μ l
10 \times transcription buffer	2 μ l
RNase inhibitor	1 μ l
T7 polymerase	2 μ l
DW	up to 20 μ l

転写産物を RNeasy (キアゲン) により精製した。

3.2.9. プロトプラストからのタンパク質抽出、ウエスタンブロット解析

プロトプラストにおけるウイルスタンパク質の蓄積量を解析するために、プロトプラストからタンパク質を抽出し、ウエスタンブロット解析を行った。

タンパク質の抽出

プロトプラストをエッペンチューブに回収し、100 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 分の条件で遠心してプロトプラストを回収した。回収したエッペンチューブを液体窒素中で瞬間凍結した。プロトプラストが溶ける前に 1 \times RIPA バッファー (10 ml あたりの組成; 1.5 mM NaCl、1%(v/v) NP40、0.5%(w/v) DOC、0.1%(w/v) SDS、50 mM Tris、Complete, Mini, EDTA-free (Roche) 1 錠、10 mM DTT) を 100 μ l 加え、ピペティングで混ぜた。1,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、10 分の条

件で遠心した。上清を 100 回収し、5×GSB (50%(v/v) glycerol、312 mM Tris、10%(w/v) SDS、500 mM DTT、0.01%(w/v) BPB) を 25 μ l 加え、65°C で 10 分間処理した。氷上で急冷し、SDS-PAGE に供試した。

SDS-PAGE、ブロットニング、ブロッキング、抗体反応、検出は 2.2.11.項と同様に行った。なお、SDS-PAGE のゲルとして、RdRp 用に NuPAGE Tris-Acetate Gels 3-8%を Tris-Acetate Buffer 内で、TGB1 および CP 用に NuPAGE Bis-Tris gel 4-12%を MES Buffer 内で、TGB2 および TGB3 用に NuPAGE Bis-Tris gel 12%を MES Buffer 内で使用した。いずれのゲルおよびバッファも Thermo Fisher Scientific 社のものである。泳動したタンパク質を転写するメンブレンとして、RdRp、TGB1、CP 用にイモビロン-P (ミリポア) を、TGB2 および TGB3 用にイモビロン-PSQ (ミリポア) を使用した。また、ウイルスタンパク質を認識する一次抗体として、抗 RdRp 抗体 (Komatsu et al., 2011)、抗 TGB1 抗体 (Okano et al., 2014)、抗 TGB2 抗体、抗 TGB3 抗体、抗 CP 抗体 (Ozeki et al., 2009) を供試した。抗 TGB2 抗血清ならびに抗 TGB3 抗血清の作製方法および抗体精製の方法は以下に述べる。

抗 TGB2 抗血清および抗 TGB3 抗血清の作製

抗 TGB2 抗血清および抗 TGB3 抗血清は人工的に合成したペプチド (TGB2; GDNLHALPHGGRY、TGB3; KQTLHHGTQPSTDL) を家兎に免疫することで得た。ペプチドの合成、家兎への免疫および採血はユーロフィンジェノミクス社に外注した。

抗体精製

本章では、抗 TGB3 抗血清の特異性を向上させるため、アフィニティ精製を行った。以下に、(i) ペプチドカラムの作製法、(ii) 抗体の精製法を述べる。

(i) ペプチドカラムの作製法

抗血清に付属して郵送されたペプチド (KQTLHHGTQPSTDL) を 0.1-0.2 g/ml となるようカップリングバッファ (0.2 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl) 1 ml に溶解した (リガンド溶液)。リガンド溶液を 12,000 × g、室温、10 分の条件で遠心し不純物を除去した。空のカラム (PD-10 empty columns, GE Healthcare) に NHS-activated Sepharose 4FF (GE Healthcare) を 1.33 ml 入れた (カラムボリュームで 1 ml)。10 ml の 1 mM HCl を注ぎ、担体に含まれるイソプロパノールを除去した。担体上部の液がなくなると同時にリガンド溶液を静かに流し込んだ。リガンド溶液がなくなる直前にカラムの上部と下部を閉じた。室温で 4 時間静置した。カラムの上部と下部をあけ、6 ml のカップリングバッファを注いだ。カラムに 6

ml の洗浄バッファー (0.1 M CH₃COONa, 0.5 M NaCl) を注いだ。カラムに 6 ml のブロッキングバッファー (0.5 M モノエタノールアミン、0.5 M NaCl) を注ぎ、室温で 1 時間静置した。カラムの上部と下部を開き、6 ml の洗浄バッファー、6 ml のブロッキングバッファー、6 ml の洗浄バッファー、6 ml のカップリングバッファーの順に注いだ。3 ml の 20% エタノールを加え、カラムの上部と下部を閉じ、4°C で保存した。

(ii) 抗体の精製法

保存に用いた 20%エタノールを除き、10 ml のリン酸バッファー (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4) を注いだ。抗血清を 5 ml 注いだ。カラムを通った抗血清を回収し、合計 6 回カラムを通した。リン酸バッファーを 3 ml ずつ注ぎ、カラムを洗浄した。カラムを通過したバッファーの吸光度が 0.005 くらいになるまで洗浄を続けた。3 M MgCl₂ を 500 µl ずつ注ぎ、抗体を溶出させた。溶出した画分のうち、分光光度計を用いて抗体含有量を測定し、抗体が含まれる画分のみを選抜した。選抜した画分をリン酸バッファーに透析した。透析膜として SnakeSkin Dialysis Tubing (Thermo Fisher Scientific) を使用した。

3.2.10. アグロインフィルトレーション

アグロインフィルトレーションによるウイルス接種は 2.2.6.項と同様に行った。ただし、濁度 (OD₆₀₀) は 0.5 に調整して行った。

3.2.11. シロイヌナズナ展開葉からのウイルスタンパク質の検出

接種葉におけるウイルスタンパク質の蓄積量を定量的に解析するため、ウエスタンブロット解析を行った。タンパク質の抽出法としては、(1) 全タンパク質の抽出法、(2) 超遠心分離による不溶性タンパク質の抽出法の 2 種類を用いた。それぞれ以下に述べる。

(1) 全タンパク質の抽出法

シロイヌナズナの葉を 2.0 ml マスターハードチューブ (バイオメディカルサイエンス) に回収した。2.0 ml チューブにメタルコーン (バイオメディカルサイエンス) を入れ、液体窒素中で凍結させた。2.0 ml チューブをシェイクマスターオート ver2.0 (バイオメディカルサイエンス) で破碎処理した。破碎した葉が溶ける前に 1×RIPA バッファーを 100 µl 加え、ピペティングで混ぜた。破碎液を新しいエッペンチューブに移し、1,000×g、4°C、10

分の条件で遠心した。上清を回収し、5×GSB (50%(v/v) glycerol、312 mM Tris、10%(w/v) SDS、500 mM DTT、0.01%(w/v) BPB) を 25 µl 加え、65°C で 10 分間処理した。氷上で急冷し、SDS-PAGE に供試した。

(2) 不溶性タンパク質の抽出法

シロイヌナズナの葉を 2.0 ml マスターハードチューブ (バイオメディカルサイエンス) に回収した。2.0 ml チューブにメタルコーン (安井器機) を入れ、液体窒素中で凍結させた。2.0 ml チューブをシェイクマスターオート ver2.0 (バイオメディカルサイエンス) で破碎処理した。破碎した葉が溶ける前にバッファーA (10 ml あたりの組成; 500 mM Tris、15 mM MgCl₂、120 mM KCl、20%(v/v) glycerol、10 mM DTT、Complete, Mini, EDTA-free (Roche) 1 錠) を 100 µl 加え、ピペティングで混ぜた。破碎液を新しいエッペンチューブに移し、1,000×g、4°C、20 分の条件で遠心した。上清を超遠心機用のチューブに回収し、41600×g、4°C、30 分の条件で遠心した。上清を可溶性画分 (S 画分) として回収した。沈殿が残っているチューブにバッファーA を 300 µl 入れ、すぐに回収した (沈殿の洗浄)。沈殿に 1.25 ×GSB を 100 µl 加え、ピペティングで沈殿を溶かした。65°C で 10 分間変性処理した。氷上で急冷し、SDS-PAGE に供試した。

ウエスタンブロット解析は 2.2.11.項と同様に行った。ただし、ウイルスタンパク質を認識する一次抗体として、抗 RdRp 抗体 (Komatsu et al., 2011)、抗 TGB1 抗体 (Okano et al., 2014)、抗 TGB2 抗血清 (3.2.9.項)、抗 TGB3 抗体 (3.2.9.項)、抗 CP 抗体 (Ozeki et al., 2009) を供試した。

3.2.12. バンドの定量

ウエスタンブロット解析によって得られた結果を定量的に解析するために、シグナルの濃度の定量を行った。定量には画像解析ソフトウェア Image J を使用した。

表 3.1 本章で使⽤したプライマーの配列

プライマー名	配列 (5'-3')
PIRep-F3	AATCCCCAGACTTCCATGAGCACC
PIRep-R3	TTTTCTTTGCGCCGAGCTTCTC
sGFP-379F	AAGGGCATCGACTTCAAGGAG
sGFP-486R	GATGCCGTTCTTCTGCTTGTC
Pr-5101F	CCGGGACCCTCTCCCACTCGCATTCCTC
Pr-6102R	GGCCCACCAGACTTTCACTGGTC

3.3. 結果

3.3.1. *ncbp* 変異体では PIAMV の細胞間移行が抑制される

2.3.1.および 2.3.3.項の解析の結果、*ncbp* 変異体の接種葉では PIAMV の蓄積量が低下することが示された。1.2.2.および 3.1.項で述べたように、*Potexvirus* 属ウイルスの感染は①細胞内での増殖、②細胞間移行、③長距離移行の 3 段階を経る。2.3.2.項の解析によって、*ncbp* 変異体では少なくとも③の長距離移行の段階は阻害されていることが明らかになった。そこで、*ncbp* 変異体において②の細胞間移行が阻害されているか否かについて解析を行った。

2.3.1.および 2.3.3.項で用いた機械接種法では複数の蛍光斑が融合することが多く、単細胞からの広がりを経量的に解析することが困難であった。この問題を解決するため、本章ではパーティクルガン法により *ncbp-1* 変異体および Col-0 の単細胞に PIAMV-GFP を接種した。接種 12 時間後、24 時間後、36 時間後に接種葉を観察したところ、いずれの時点でも *ncbp-1* 変異体における蛍光斑の大きさは Col-0 に比べて小さかった。この結果を経量的に解析するため、GFP 蛍光を発する領域の面積を測定した。その結果、いずれの時点でも *ncbp-1* 変異体では Col-0 に比べて蛍光斑の大きさが有意に低下していた (図 3.2)。これらの結果から、*ncbp-1* 変異体では PIAMV-GFP の細胞間移行が阻害されていることが示された。

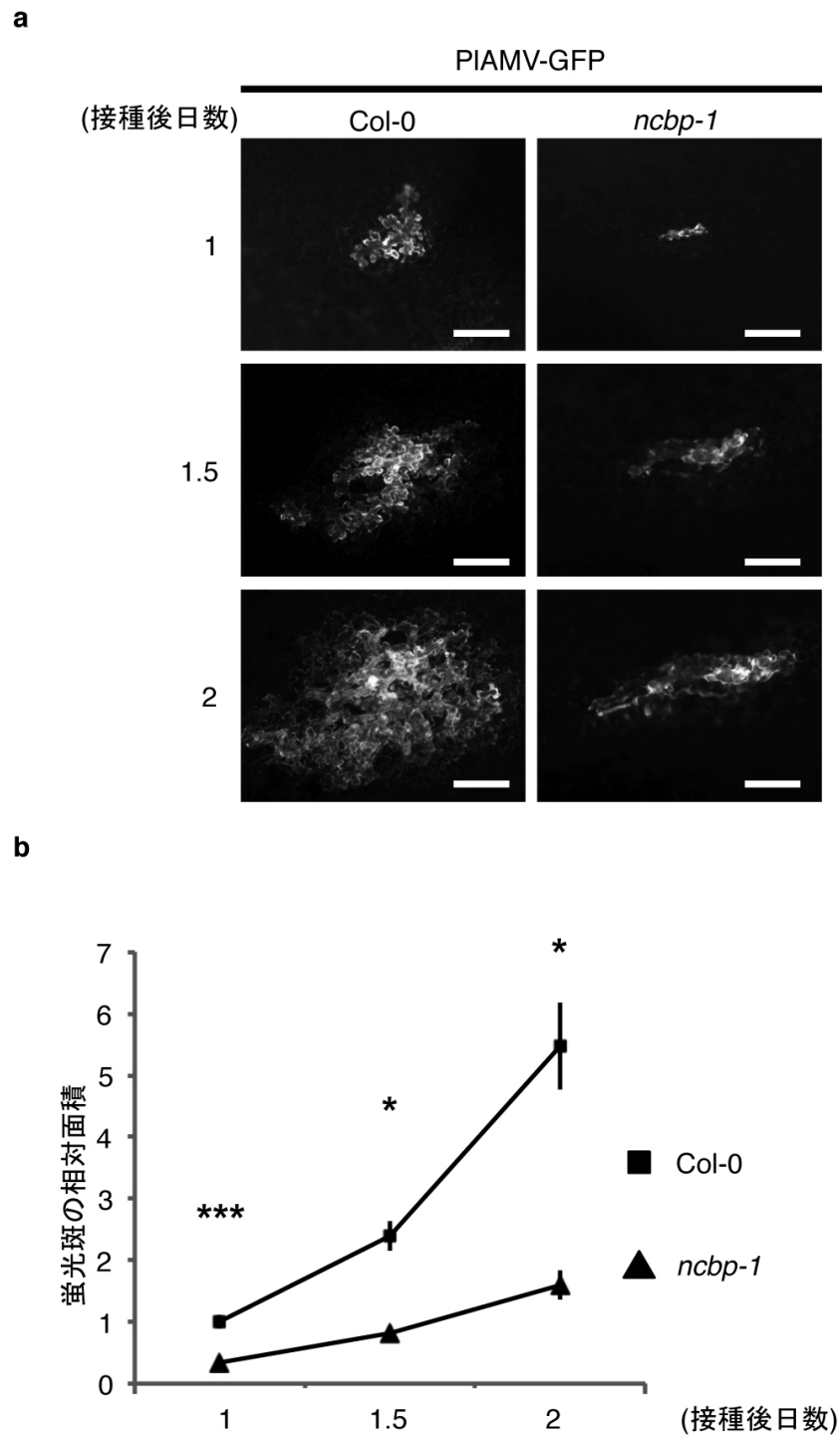


図 3.2 *ncbp-1* 変異体では PIAMV-GFP の細胞間移行が阻害される

a. 表皮細胞における PIAMV-GFP の蛍光写真。*ncbp-1* 変異体および Col-0 のロゼット葉にボンバードメント法により PIAMV-GFP を導入した。導入 12 時間後、24 時間後、36 時間後に蛍光写真を撮影した。スケールバーは 200 μ m を示す。

b. 接種葉における蛍光斑の大きさの定量。**a.**で示した蛍光斑をソフトウェア (Image J

v1.40) により定量した。1 回の実験で少なくとも 5 つ以上の蛍光斑を解析した。*ncbp-1* 変異体における蛍光斑の大きさを、接種 12 時間後の Col-0 における蛍光斑の大きさを 1.0 とした相対値として算出した。エラーバーは標準誤差を示す。アスタリスクは有意差が認められたことを示す (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$)。

3.3.2. *ncbp* 変異体では PIAMV の単細胞における増殖は阻害されない

3.3.1. 項の解析の結果、*ncbp-1* 変異体では PIAMV-GFP の②細胞間移行が阻害されていることが示唆された。そこで、細胞間移行の前の段階である①細胞内での増殖が阻害されているか否かについて解析を行った。*ncbp-1* 変異体および Col-0 の展開葉よりプロトプラストを調製し、PIAMV の感染性 cDNA クローンおよび外部標準として GFP を発現するプラスミド (Chiu et al., 1996) を導入した。導入 0 時間後、12 時間後、24 時間後にプロトプラストを回収した。これらのプロトプラストより全 RNA を抽出し、定量 RT-PCR によりウイルス RNA の蓄積量を定量した。その結果、*ncbp-1* 変異体より調製したプロトプラストにおけるウイルス RNA の蓄積量は、Col-0 における蓄積量と同等であった (図 3.3)。

プロトプラストにおけるウイルスの蓄積をより詳細に解析するために、ゲノム RNA、マイナス鎖 RNA、サブゲノム RNA の検出を行った。*ncbp-1* 変異体および Col-0 由来のプロトプラストに PIAMV の感染性 cDNA クローンを導入し、3 日後にプロトプラストを回収した。これらのプロトプラストより抽出した全 RNA を電気泳動により分画し、プラス鎖 RNA を検出するプローブ、もしくはマイナス鎖 RNA を検出するプローブを用いたノーザンブロット解析を行った。その結果、*ncbp-1* 変異体由来のプロトプラストにおけるゲノム RNA の蓄積量、マイナス鎖 RNA の蓄積量、サブゲノム RNA1 および 3 の蓄積量は Col-0 由来のプロトプラストにおけるそれらと同等であった (図 3.4)。しかしながら、サブゲノム RNA2

は *ncbp-1* 変異体および Col-0 のいずれにおいても検出されなかった (図 3.4)。この原因としては、サブゲノム RNA2 の蓄積量が低いことが考えられた。以上の結果から、nCBP が欠損しても単細胞におけるゲノム RNA の蓄積には影響がないことが示された。また、3.3.1. 項の結果と合わせて考えると、*ncbp-1* 変異体ではウイルスの単細胞におけるゲノム RNA の蓄積には影響がないが、細胞間移行は阻害されることが示唆された。

a

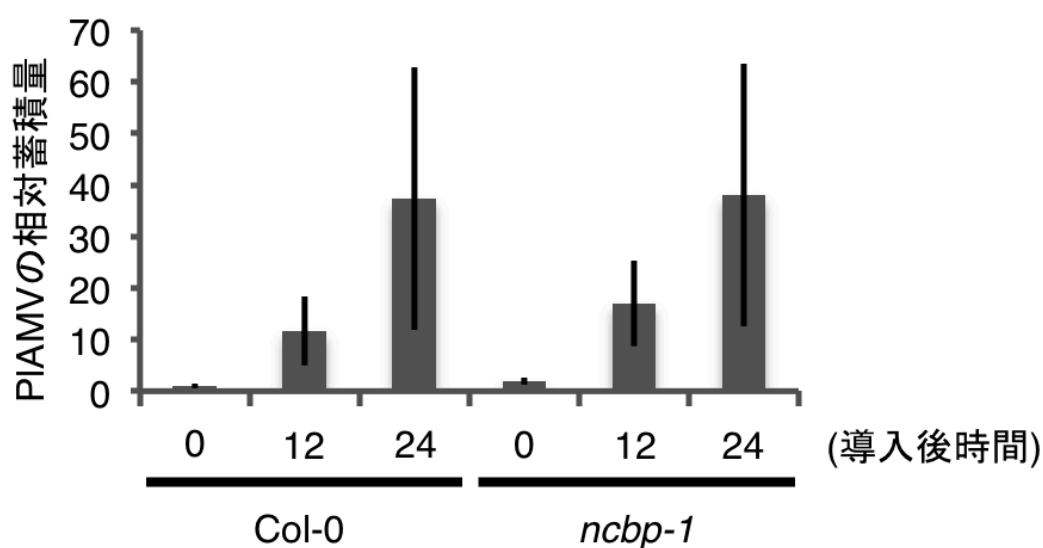


図 3.3 プロトプラストにおけるウイルス RNA の定量的解析

ncbp-1 変異体および Col-0 よりプロトプラストを調製し、PIAMV をコードするプラスミドおよび GFP を発現するプラスミドを導入した。導入 0 時間後、12 時間後、24 時間後に全 RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法によりウイルス蓄積量を解析した。各サンプルにおけるウイルス蓄積量を GFP mRNA の蓄積量で標準化し相対蓄積量を算出した。*ncbp-1* 変異体におけるウイルス蓄積量を、接種 0 時間後の Col-0 におけるウイルス蓄積量を 1.0 とした相対値として算出した。エラーバーは標準誤差を示す。

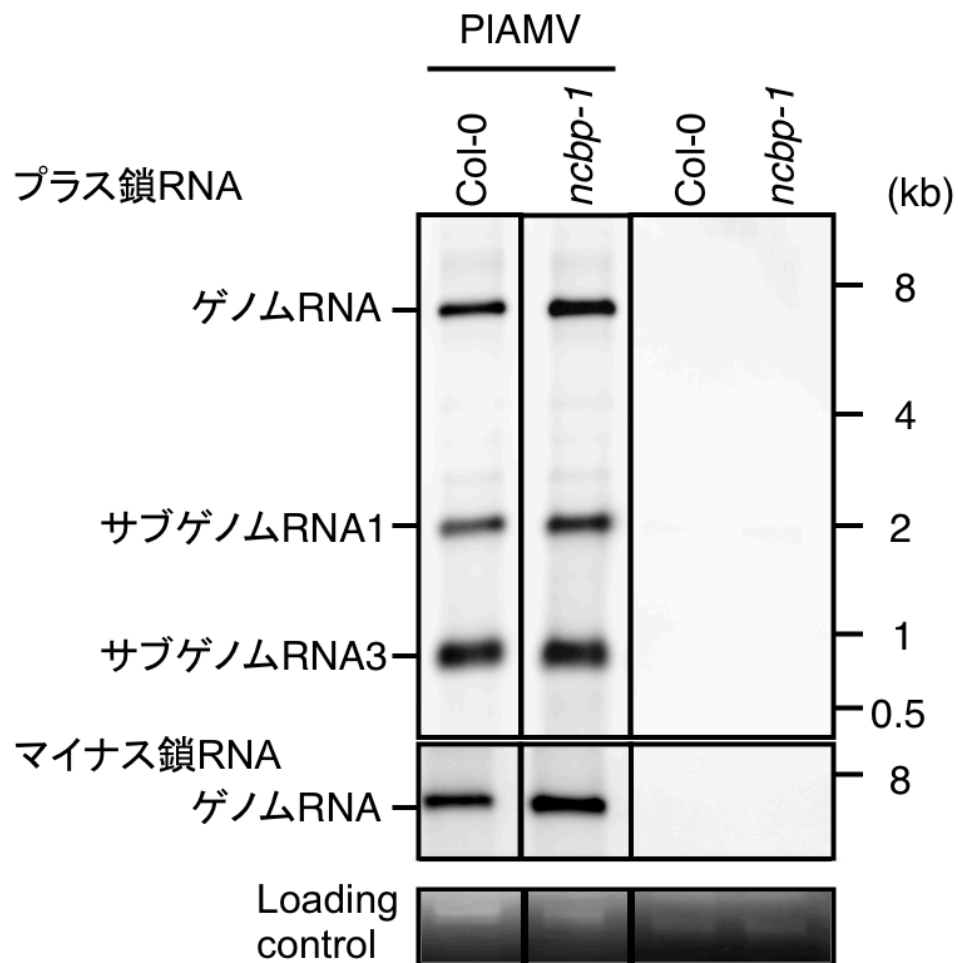


図 3.4 ノーザンブロット解析によるウイルス RNA の検出

ncbp-1 変異体および Col-0 よりプロトプラストを調製し、PIAMV をコードするプラスミドを導入した。3 日後に全 RNA を抽出し、ノーザンブロット解析によりウイルス RNA を検出した。最下段は、泳動量のコントロールとしてリボソーム RNA のエチジウムブロマイド染色像を示す。

3.3.3. プロトプラストにおけるウイルスタンパク質の検出

3.3.1.項の解析の結果、*ncbp-1* 変異体では PIAMV の細胞間移行が阻害されることが示唆された。*nCBP* が翻訳開始因子であることをふまえると、*ncbp-1* 変異体ではウイルスの細胞間移行に必要なウイルスタンパク質の蓄積が抑制されている可能性が考えられた。そこで、この仮説を検証するために、*ncbp-1* 変異体および Col-0 由来のプロトプラストに PIAMV の感染性 cDNA クローンを導入し、ウエスタンブロット解析によりウイルスタンパク質の検出を試みた。その結果、*ncbp-1* 変異体および Col-0 由来のプロトプラストのいずれにおいても、RdRp、TGB1、CP が同程度に蓄積していることが明らかになった (図 3.5)。しかしながら、TGB2 および TGB3 は *ncbp-1* 変異体および Col-0 のいずれにおいても検出されず (図 3.5)、蓄積量について評価することができなかった。

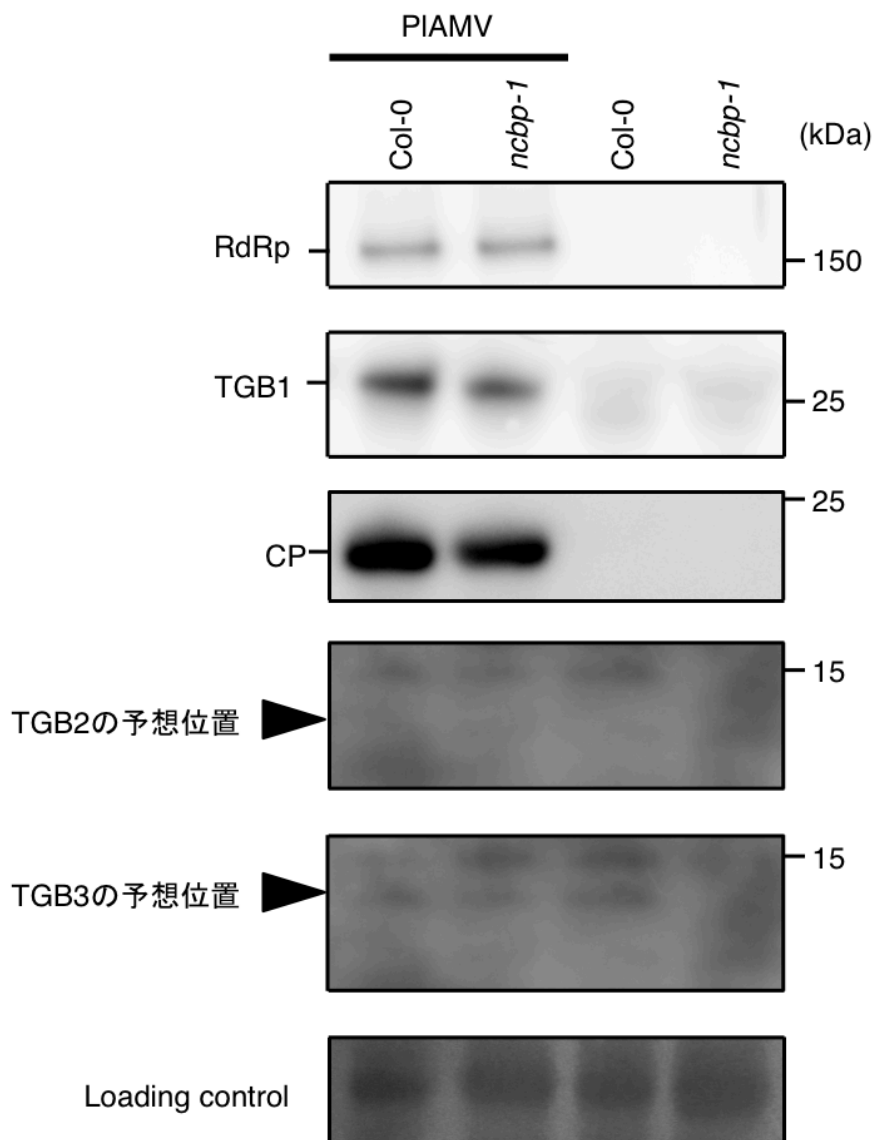


図 3.5 プロトプラストにおけるウイルスタンパク質の検出

ncbp-1 変異体および *Col-0* よりプロトプラストを調製し、PIAMV の感染性 cDNA クローンを導入した。3 日後に抽出した全タンパク質を供試してウエスタンブロット解析を行った。検出に際しては抗 RdRp 抗体、抗 TGB1 抗体、抗 CP 抗体、抗 TGB2 抗血清、抗 TGB3 抗血清を用いた。ネガティブコントロールとして非導入プロトプラストから抽出した全タンパク質を泳動した。

3.3.4. *ncbp* 変異体では移行タンパク質 TGB2 および TGB3 の蓄積量が減少する

3.3.3.項におけるプロトプラストを用いた実験系では、TGB2 および TGB3 を検出することができなかった。この理由として、プロトプラストを用いた実験系ではウイルスの感染効率が低く、TGB2 および TGB3 が十分に蓄積していないことが考えられた。そこで本章では、アグロインフィルトレーション法によりシロイヌナズナの展開葉に効率的にウイルスを接種することを試みた。アグロインフィルトレーション法を用いることで、アグロバクテリウムを注入した領域に対して一様にウイルスを接種することができる。PIAMV-GFP の感染性 cDNA クローンを形質転換したアグロバクテリウムを *ncbp-1* 変異体および Col-0 の展開葉に注入し、4 日後に接種葉を回収した。これらの葉から全タンパク質を抽出し、ウエスタンブロット解析を行った。その結果、RdRp、TGB1 および CP の蓄積量は *ncbp-1* 変異体および Col-0 で同等であった (図 3.6a)。この結果は、プロトプラストにおけるウイルスタンパク質の検出結果と同じ結果であった。一方、*ncbp-1* 変異体における TGB2 の蓄積量は、Col-0 における蓄積量と比較して大きく低下した (図 3.6a)。しかしながら、TGB3 タンパク質のバンドは非特異的のバンドと区別ができず、蓄積量を評価することができなかった。

次に、得られたウエスタンブロット像から各ウイルスタンパク質のバンドの濃さを測定することで、ウイルスタンパク質の蓄積量を定量的に解析した。3.3.2.および 3.3.3.項の結果から、*ncbp-1* 変異体および Col-0 のプロトプラストでは PIAMV のゲノム RNA および RdRp の蓄積量が変わらないことが示唆されている。そこで本章では、RdRp の蓄積量を基準として TGB1、TGB2、CP の相対蓄積量を算出した。その結果、TGB1 および CP の蓄積量は *ncbp-1* 変異体および Col-0 の間で大きく変わらなかったのに対して、TGB2 の蓄積量

は *ncbp-1* 変異体で有意に低下した (図 3.6b)。これらの結果から、*ncbp-1* 変異体では TGB2 の蓄積量が低下することが明らかになった。

既報において、TGB3 は小胞体 (endoplasmic reticulum; ER) 膜と相互作用することが報告されている (Chou et al., 2013)。そこで、シロイヌナズナの接種葉から不溶性画分を精製し、TGB3 を非特異のバンドと区別して特異的に検出することを試みた。Col-0 の展開葉に PIAMV-GFP をアグロインフィルトレーション法により接種し、4 日後に接種葉を回収した。接種葉より抽出した全タンパク質を超遠心分離法により分画し、可溶性画分 (S30) と不溶性画分 (P30) を得た。これらの画分を用いて抗 TGB3 抗体によるウエスタンブロット解析を行ったところ、非特異のバンドは S30 画分のみで検出された (図 3.7)。この結果から、P30 画分を用いることで TGB3 の蓄積量の評価が可能であることが明らかになった。

次に、*ncbp-1* 変異体および Col-0 に PIAMV-GFP をアグロインフィルトレーション法により接種し、4 日後に接種葉を回収した。接種葉より P30 画分を調製し、ウエスタンブロット解析により RdRp および TGB3 の検出を行った。その結果、*ncbp-1* 変異体における TGB3 の蓄積量は Col-0 における蓄積量と比べて大きく低下することが明らかになった (図 3.8a)。バンドの濃さを測定することで TGB3 の相対蓄積量を定量したところ、TGB3 の蓄積量は Col-0 に比べて *ncbp-1* 変異体で有意に低下することが示された (図 3.8b)。

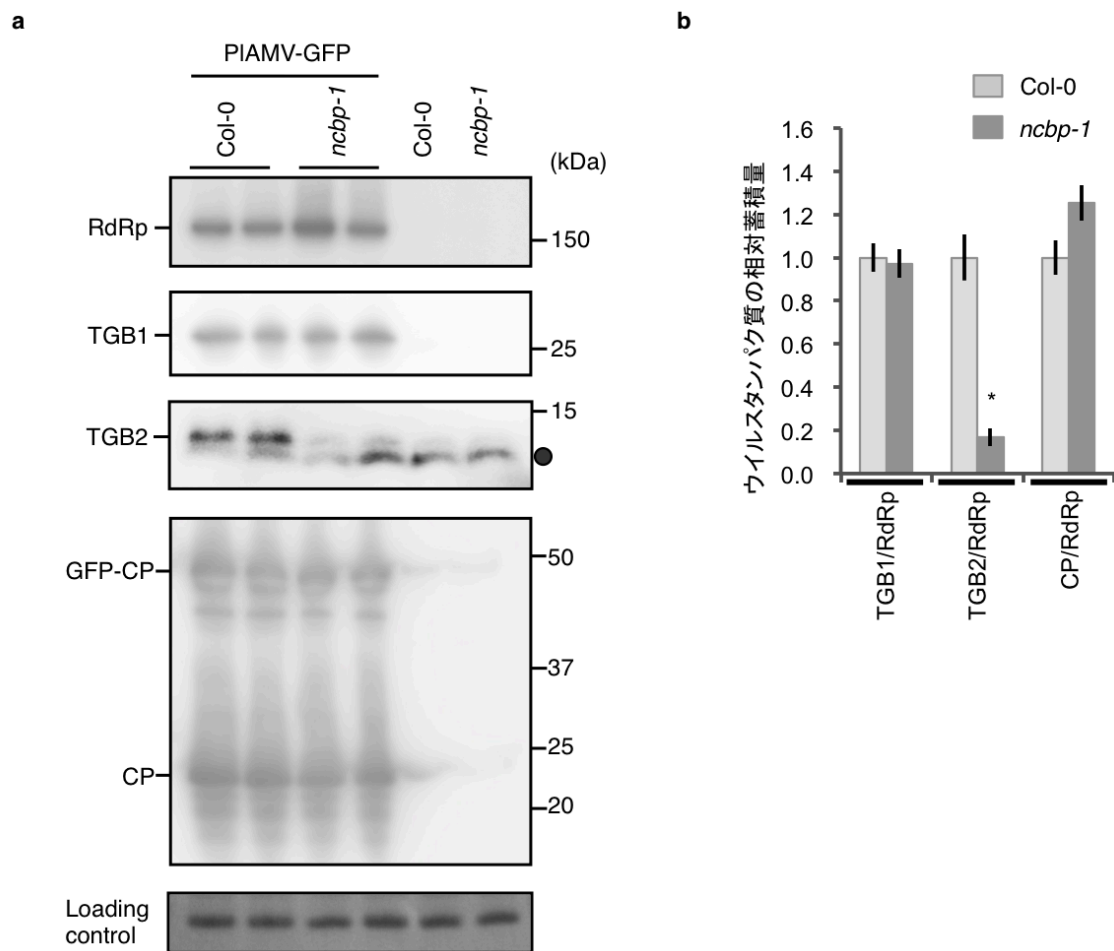


図 3.6 *ncbp-1* 変異体では TGB2 の蓄積量が低下する

a. *ncbp-1* 変異体および Col-0 におけるウイルスタンパク質の検出。*ncbp-1* 変異体および Col-0 にアグロインフィルトレーション法により PIAMV-GFP を接種し、4 日後に抽出した全タンパク質を供試してウエスタンブロット解析を行った。検出に際しては抗 RdRp 抗体、抗 TGB1 抗体、抗 CP 抗体、抗 TGB2 抗血清を用いた。ネガティブコントロールとして非接種葉から抽出した全タンパク質を泳動した。PIAMV を接種した葉から抽出した全タンパク質については独立な実験から得られた 2 反復を泳動した。

b. *ncbp-1* 変異体および Col-0 における TGB1、TGB2、CP の相対蓄積量。TGB1、TGB2、CP のバンドの濃さを定量し、RdRp のバンドの濃さで標準化した。*ncbp-1* 変異体におけるウイルスタンパク質の蓄積量を、Col-0 における蓄積量を 1.0 とした相対値として産出した。エラーバーは 5 サンプルの標準誤差を示す。アスタリスクは有意差が認められたことを示す (*, $p < 0.5$)。

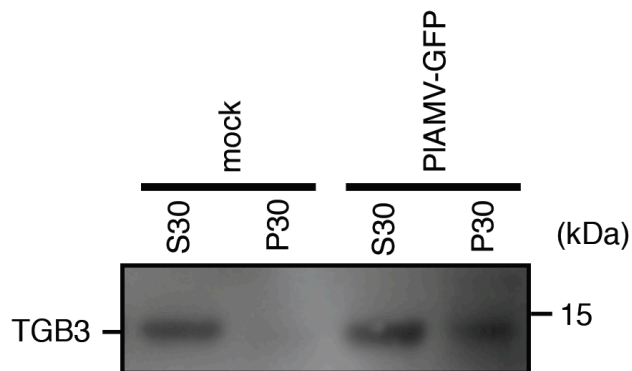


図 3.7 超遠心分離法を用いた TGB3 タンパク質の特異的検出

Col-0 にアグロインフィルトレーション法により PIAMV-GFP を接種した。接種 4 日後に全タンパク質を抽出し、超遠心分離により可溶性画分 (S30) と不溶性画分 (P30) に分画した。これらの画分を供試し、抗 TGB3 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。

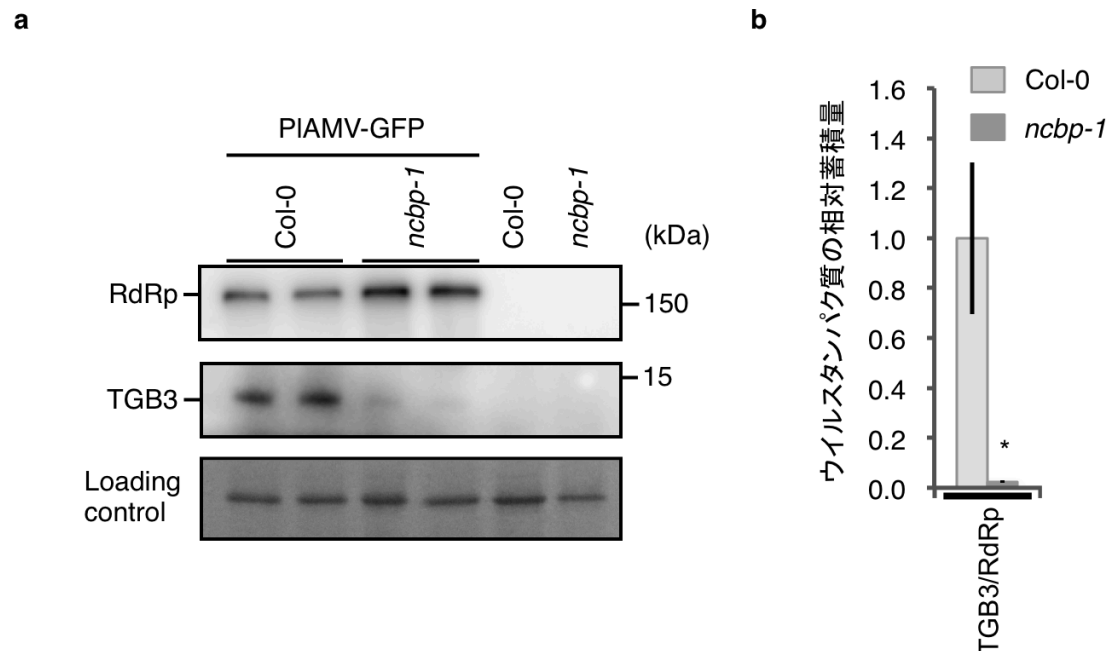


図 3.8 *ncbp-1* 変異体では Col-0 と比べて TGB3 タンパク質の蓄積量が低下する

a. *ncbp-1* 変異体および Col-0 における TGB3 の検出。*ncbp-1* 変異体および Col-0 にアグロインフィルトレーション法により PIAMV-GFP を接種し、4 日後に調製した P30 画分を供試してウエスタンブロット解析を行った。検出に際しては抗 RdRp 抗体および抗 TGB3 抗体を用いた。ネガティブコントロールとして非接種葉から調整した P30 画分を泳動した。PIAMV を接種した葉から抽出した P30 画分については独立な実験から得られた 2 反復を泳動した。

b. *ncbp-1* 変異体および Col-0 における TGB3 の相対蓄積量。TGB3 のバンドの濃さを定量し、RdRp のバンドの濃さで標準化した。*ncbp-1* 変異体における TGB3 の蓄積量を、Col-0 における蓄積量を 1.0 とした相対値として産出した。エラーバーは 5 サンプルの標準誤差を示す。アスタリスクは有意差が認められたことを示す (*, $p < 0.5$)。

3.4. 考察

3.4.1. nCBP は TGB2 および TGB3 の蓄積を促進する

本章では、*ncbp* 変異体と野生型植物における PIAMV の感染動態を比較することによって、PIAMV の感染における nCBP の機能に迫ることを目的として解析を行った。3.3.1.項により、*ncbp* 変異体ではウイルスの細胞間移行が阻害されていることを明らかにした。次いで 3.3.2.項では、単細胞におけるウイルス蓄積量を解析し、ゲノム RNA、サブゲノム RNA1、サブゲノム RNA3 の蓄積量が *ncbp* 変異体および野生型植物で同等であることを示した。この結果から、これらのウイルス RNA の合成に nCBP は関わらないことが明らかになった。さらに、3.3.4.項の *ncbp* 変異体および野生型植物におけるウイルスタンパク質の蓄積量の解析から、*ncbp* 変異体では TGB2 および TGB3 の蓄積量が顕著に低下することが示された。TGB2 および TGB3 の蓄積量の低下とウイルスの細胞間移行の抑制との関連性については事項で述べることとし、本項では *ncbp* 変異体で TGB2 および TGB3 の蓄積量が低下した機構について考察する。

既報で、TGB2 および TGB3 はサブゲノム RNA2 より翻訳されることが示唆されている (Verchot et al., 1998)。本章の解析では、*ncbp* 変異体および野生型植物のいずれから、サブゲノム RNA2 は検出されず、*ncbp* 変異体においてサブゲノム RNA2 の蓄積が抑制されたか否かは評価できなかった。nCBP がサブゲノム RNA2 の蓄積に関わる場合、①nCBP が RdRp によるサブゲノム RNA2 の転写を促進している可能性、②nCBP が PIAMV のサブゲノム RNA2 の分解を抑制している可能性が考えられる (図 3.9)。Potexvirus 属ウイルスのサブゲノム RNA2 を報告している論文では実験に PVX を用いて解析を行っていることから (Verchot et al., 1998)、本章でサブゲノム RNA2 が検出できなかった理由の一つとして、PIAMV のサブゲノム RNA2 の安定性が低い可能性が考えられる。したがって、①や②の仮

説を検証するためには、nCBP を欠損した植物を用いて PVX のサブゲノム RNA2 の蓄積量を解析することが有用であろう。

サブゲノム RNA2 の転写促進および分解抑制に nCBP が関わらない場合、③nCBP がサブゲノム RNA2 からの TGB2 および TGB3 の翻訳を促進している可能性、④nCBP が TGB2 および TGB3 を安定化している可能性などが考えられる (図 3.9)。nCBP がキャップ構造に結合する翻訳開始因子であり (Ruud et al., 1998; Joshi et al., 2005; Kropiwnicka et al., 2015)、in vitro では翻訳を促進する報告 (Ruud et al., 1998) をふまえると、③の可能性が有力であると考えられる。この仮説を直接的に検証するためには、サブゲノム RNA2 からの翻訳活性試験などが必要である。また、④の可能性を検証するためには、nCBP が存在する条件と存在しない条件で TGB2 および TGB3 の分解速度に差があるかどうかを調べるなどの実験が考えられるだろう。今後の解析によって nCBP の分子機能が明らかになることが期待される。

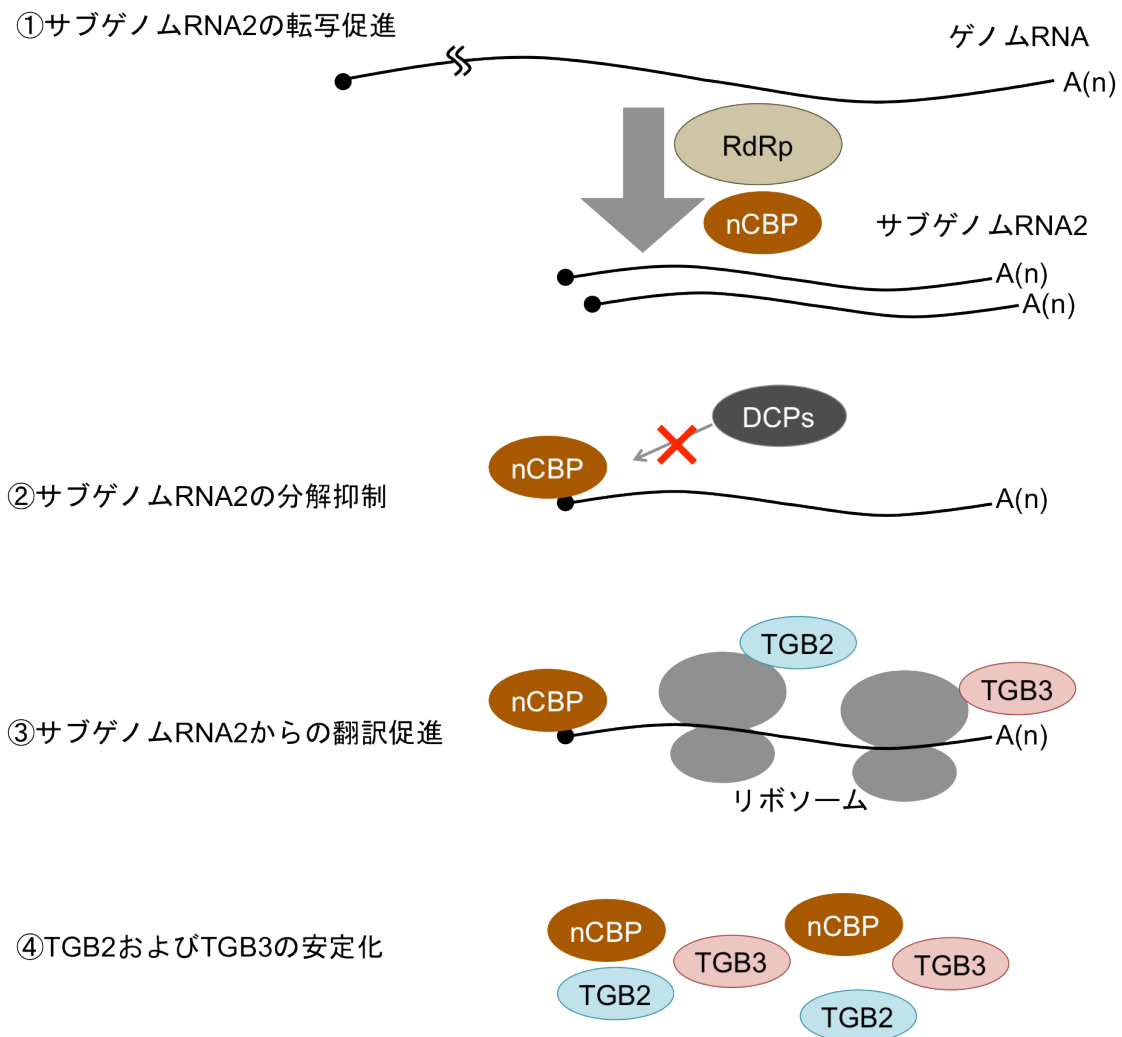


図 3.9 PIAMV の感染における nCBP の役割

本論文の結果から、nCBP の機能としては少なくとも以下の 4 つの可能性が考えられた。① nCBP がサブゲノム RNA2 の転写を促進している可能性、②nCBP が DCP1 や DCP2 などの脱キャップ酵素 (Iwasaki et al., 2007) の機能を阻害している可能性、③nCBP がサブゲノム RNA2 からの TGB2 および TGB3 の翻訳を促進している可能性、④nCBP が TGB2 および TGB3 の安定性を向上させている可能性である。図の黒丸はキャップ構造、線はゲノム RNA ならびにサブゲノム RNA2、灰色の構造はリボソームをそれぞれ示す。

3.4.2. TGB2 および TGB3 の蓄積量低下は細胞間移行の阻害の原因となる

本章の解析の結果、*ncbp* 変異体では PIAMV の細胞間移行が阻害されることが明らかになった。1.2.2.および 3.1.項で述べたように、植物ウイルスが細胞間を移行するためには、ウイルス RNA が細胞内を移行し PD へと到達すること、そして PD を通過することが必須である。

Potexvirus 属ウイルスの細胞間移行においては、3 つの移行タンパク質である TGB1、TGB2、TGB3 および CP が協調して機能することが明らかになっている。TGB2 および TGB3 は ER 膜からなる小胞構造 (TGB2/3 小胞, TGB2/3 granule; 図 3.10) を形成する (Ju et al., 2005; Tilsner et al., 2013)。TGB2/3 小胞の内部にはリボソームおよび RdRp が存在することから、内部でウイルスタンパク質が翻訳されるとともにウイルス RNA が複製していると考えられている (Ju et al., 2005; Bamunusinghe et al., 2009)。TGB2/3 小胞は最終的に PD へと輸送される (Tilsner et al., 2013; 図 3.10A)。*Potexvirus* 属ウイルスのウイルスタンパク質のうち、TGB1 および TGB2 に PD の SEL を拡大する活性が報告されている (Tamai and Meshi, 2001; Howard et al., 2004)。TGB1、TGB2、TGB3 に加え、CP もポテックスウイルスの細胞間移行に関わることが明らかになっている (Chapman et al., 1992; Ozeki et al., 2009)。RdRp、TGB2/3 小胞、TGB1、CP、ウイルス RNA が PD で重層構造 (PD cap; 図 3.10B) を形成する (Tilsner et al., 2013)。*Potexvirus* 属ウイルスは PD cap を形成することで、PD の近傍で移行タンパク質や複製酵素を翻訳し、かつウイルスゲノムを複製しながら効率的にウイルスゲノムを隣接細胞へと移行させていると考えられている (Tilsner et al., 2013)。

これらのウイルスタンパク質のいずれが欠損した場合にも、ポテックスウイルスの細胞間移行能は失われる (Tilsner et al., 2013)。したがって、*ncbp* 変異体で PIAMV の細胞間移

行が阻害された結果は、TGB2 および TGB3 の蓄積量が著しく低下したことが原因であると解釈できる。

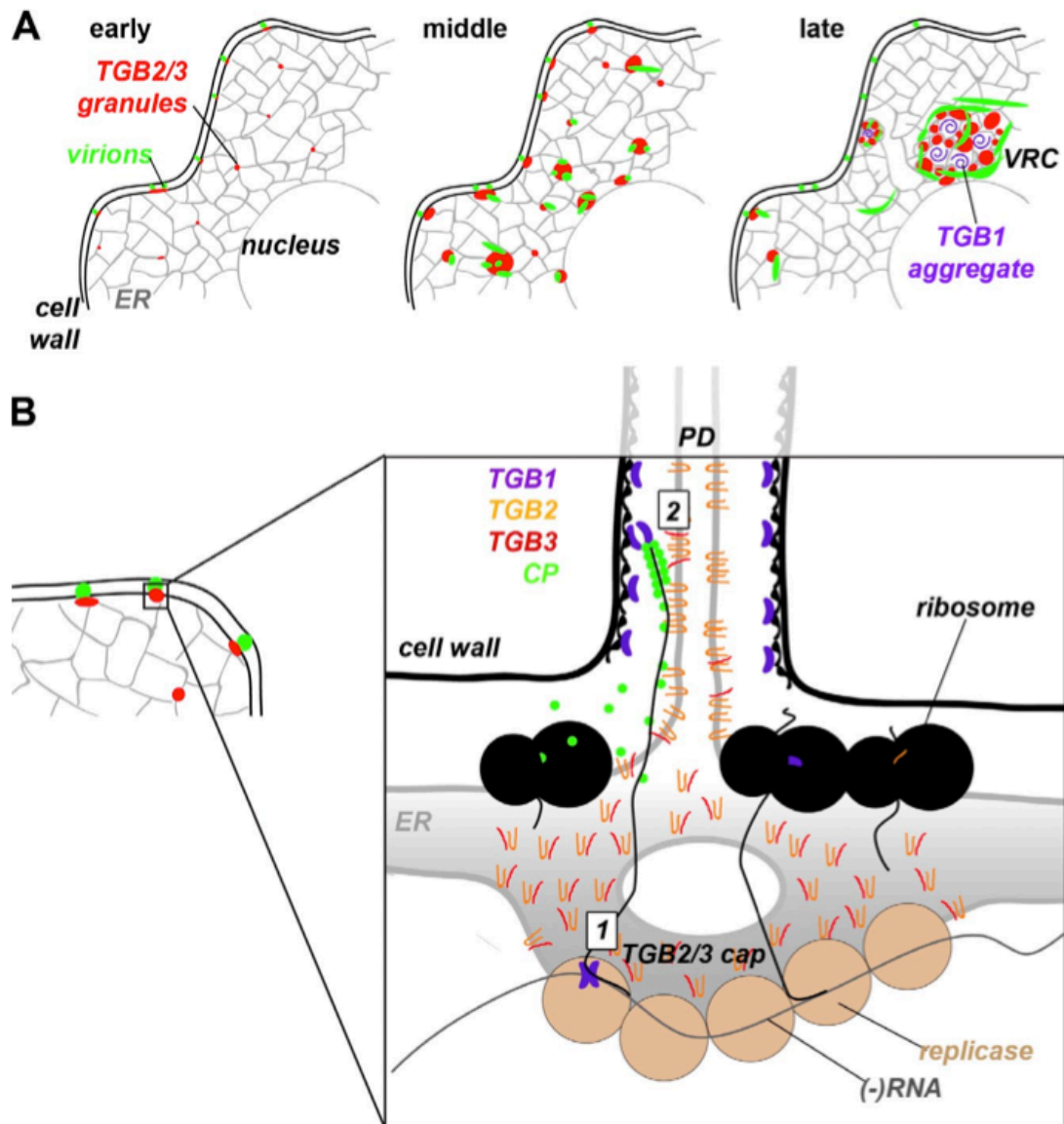


図 3.10 PD 近傍における *Potexvirus* 属ウイルスのウイルスタンパク質複合体 (Tilsner et al., 2013)

A. *Potexvirus* 属ウイルスが感染した細胞における TGB1、TGB2、TGB3、CP の細胞内動態。左から感染初期 (early)、感染中期 (middle)、感染後期 (late) を示す。感染初期には、TGB2/3 小胞 (TGB2/3 granule) が ER 膜上に形成される。TGB2/3 小胞は一定の割合で PD 近傍に

存在する。また細胞内には粒子も観察される。感染中期には、TGB2/3 小胞同士が融合し、より大きな構造が形成される。感染後期には核周辺においてウイルス複製複合体 (VRC) が形成される。VRC 内には TGB1 が凝集していること (TGB1 aggregate) が示されている (Tilsner et al., 2012)。

B. PD の近傍で形成される PD cap の模式図。TGB2 および TGB3 は PD の近傍の ER 膜を変性させ、そこに小さな VRC を形成させる。TGB2 および TGB3 は PD 内部の ER 膜にも存在する。PD cap で複製された新生ウイルスゲノムが PD へと移行し (四角 1)、部分的に粒子化されたウイルスゲノムが PD を通過すると考えられている (四角 2)。

第 4 章 総合考察

4.1. nCBP は TGB 型の移行タンパク質を有する *Alphaflexivirus* 科ウイルスおよび *Betaflexivirus* 科ウイルスの感染に関わる

本論文では、*Potexvirus* 属ウイルスの感染に eIF4E アイソフォームが関与するか否かを明らかにすることを目的として解析を行った。第 2 章では、PIAMV は eIF4E アイソフォームのうち nCBP を特異的に利用して感染していることを明らかにした。この結果は、nCBP が植物ウイルスの感染に関わることを初めて示したものである。3 種類の eIF4E アイソフォームのうち、eIF4E および eIFiso4E が植物ウイルスの感染に必要であるというこれまでの知見 (Sanfaçon, 2015; Truniger and Aranda, 2009) と合わせると、3 種類の eIF4E アイソフォームは全て植物ウイルスの感染に関わることが明らかになった。

また第 3 章の結果から、nCBP は PIAMV の移行タンパク質である TGB2 および TGB3 の蓄積を介して PIAMV の細胞間移行に関与していることが推察された。さらに第 2 章では、nCBP を利用するウイルスは *Alphaflexivirus* 科 *Potexvirus* 属のみならず、*Alphaflexivirus* 科 *Lolavirus* 属、*Betaflexivirus* 科 *Carlavirus* 属にも存在することを示した。興味深いことに、今回 nCBP を利用することが明らかになったウイルスは全て TGB タンパク質をゲノムに有している (図 1.6)。したがって、nCBP はこれらの多様な植物ウイルスの TGB 型の移行タンパク質の蓄積を正に制御することで、細胞間移行に寄与しているのかもしれない。TGB 型の移行タンパク質を持たない *Alphaflexivirus* 科および *Betaflexivirus* 科ウイルスの感染に nCBP が関わるか否かを調べることでこの仮説の妥当性が検証できるだろう。さらに、*ncbp* 変異体において PIAMV 以外の *Alphaflexivirus* 科および *Betaflexivirus* 科ウイルスの TGB2

および TGB3 の蓄積量が低下するか否かを解析することも重要である。

TGB 型の移行タンパク質をコードする植物ウイルスとして、*Alphaflexivirus* 科および *Betaflexivirus* 科ウイルスの他に、*Virgavirus* 科 *Hordeivirus* 属ウイルス、*Virgavirus* 科 *Pecluvirus* 属ウイルス、*Virgavirus* 科 *Pomovirus* 属ウイルスおよび *Benyvirus* 科 *Benyvirus* 属ウイルスが知られている (Verchot-Lubicz et al., 2010)。これらのウイルスの TGB タンパク質の翻訳にも、*Alphaflexivirus* 科および *Betaflexivirus* 科ウイルスと同様に、2 本のサブゲノム RNA が必要であると考えられている (Verchot-Lubicz et al., 2010)。したがって、これらの植物ウイルスの感染にも nCBP が関わる可能性が考えられ、今後の解析に興味を持たれる。

4.2. ウイルスのゲノム構造と翻訳開始因子の特異的利用

植物はゲノム中に 3 種類の eIF4E アイソフォームを有しており、いずれかの因子を単独で欠損しても生育に影響は生じない (Duprat et al., 2002; Lellis et al., 2002; Reinbold et al., 2013; Patrick et al., 2014)。この結果は、翻訳の開始に際して eIF4E アイソフォームが機能的に重複しているためであると解釈されている。しかしながら、単一の eIF4E アイソフォームを欠損した植物において植物ウイルスの感染性が低下する事例が多数報告されている (Truniger and Aranda, 2009; Sanfaçon, 2015)。この現象は、植物ウイルスが eIF4E アイソフォームを特異的に利用しているためであると考えられている (Truniger and Aranda, 2009)。植物ウイルスによる eIF4E アイソフォームの特異的な利用は、植物ウイルスが有する独特な翻訳機構と関係があるのかもしれない。実際、植物ウイルスの多くは 5'末端のキャップ構造または 3'末端のポリ A 配列を持たない (表 4.1)。これらはいずれも翻訳の開始

において重要な役割を果たす構造であるため (Sachs, 2000)、植物ウイルスは代替となる構造を獲得してきた。例えば、ウイルスゲノム中に存在する cis-element へ直接翻訳開始因子をリクルートする構造などである (Dreher et al., 2006; Newburn and White, 2015)。このような構造として *Tombusvirus* 科ウイルス、*Umbravirus* 属ウイルス、*Luteovirus* 属ウイルスの 3' cap-independent translation element (3'CITE) が知られている (Simon and Miller, 2014)。3'CITE に特定の翻訳開始因子が直接結合することで、キャップ構造およびポリ A 配列が存在しなくとも、効率的にリボソームをリクルートしウイルスタンパク質を翻訳することができる (Dreher et al., 2006; Simon and Miller, 2014)。すなわち、キャップ構造やポリ A 配列を持たない植物ウイルスは特定の翻訳開始因子に依存してウイルスタンパク質を翻訳しているため、eIF4E アイソフォームを欠損させることでこれらのウイルスに対して抵抗性となると考えられている (Dreher et al., 2006; Sanfaçon, 2015)。

本論文では、キャップ構造およびポリ A 配列を有する植物ウイルスである *Alphaflexivirus* 科および *Betaflexivirus* 科ウイルスを用いて解析を行い、これらのウイルスの蓄積量が *ncbp* 変異体で低下することを明らかにした (図 2.2)。この結果はキャップ構造およびポリ A 配列を有する植物ウイルスが eIF4E アイソフォームを特異的に利用して感染することを初めて明らかにしたものがある。したがって、eIF4E アイソフォームを欠損させることで抵抗性を付与する戦略がキャップ構造およびポリ A 配列を有する植物ウイルスに対しても有効であると考えられた。

しかしながら、nCBP がキャップ構造を介して *Alphaflexivirus* 科および *Betaflexivirus* 科ウイルスの感染に寄与しているかには検証の余地がある。本論文では、*ncbp* 変異体でポテックスウイルスの TGB2 および TGB3 の蓄積量が低下することが明らかになった。TGB2 および TGB3 はサブゲノム RNA2 より翻訳されることが示されているが (Verchot et al.,

1998)、サブゲノム RNA2 にキャップ構造が存在するか否かは検証されていない。したがって、サブゲノム RNA2 キャップ構造が存在しない場合には、サブゲノム RNA2 上の cis-element を介して TGB2 および TGB3 が翻訳される可能性が考えられる。

表4.1 eIF4Eアイソフォームを特異的に利用するウイルスのゲノムの末端構造

利用するeIF4Eアイソフォーム	ウイルス種	ウイルス属	ウイルスゲノムの末端構造	
eIF4E	BYMV	<i>Potyvirus</i>	VPg	A(n)
	CIYVV			
	CVYV			
	ERV			
	LMV			
	MWMV			
	PepMoV			
	PepSMV			
	PepYMV			
	PPV			
	PVV			
	PVY			
	TEV			
	ZYMV			
	BaMMV	<i>Bymovirus</i>	VPg	A(n)
	BaYMV			
	CMV	<i>Cucumovirus</i>	cap	OH
	MNSV	<i>Carmovirus</i>	-	OH
eIFiso4E	ChiVMV	<i>Potyvirus</i>	VPg	A(n)
	LMV			
	TuMV			
	PVMV			

宿主の mRNA と異なる末端構造の箇所は背景をオレンジ色とした。*Potyvirus* 属ウイルスおよび *Bymovirus* 属ウイルスの 5'末端にはウイルスタンパク質 VPg が共有結合している。*Carmovirus* 属ウイルスの 5'末端にはキャップ構造は存在しない。*Cucumovirus* 属ウイルスおよび *Carmovirus* 属ウイルスの 3'末端にはポリ A 配列は存在しない。

4.3. *Potyvirus* 属ウイルスおよび *Tobamovirus* 属ウイルスと eIF4E アイソフォームとの関わり

本論文では、nCBP を利用する植物ウイルスを明らかにするために、*ncbp* 変異体を用いて接種試験を行った。その結果、*Alphaflexivirus* 科および *Betaflexivirus* 科に属する植物ウ

イルスが nCBP を利用していることが示唆された。一方、*Potyvirus* 科 *Potyvirus* 属に属する TuMV および *Virgavirus* 科 *Tobamovirus* 属に属する YoMV は nCBP を特異的に利用していないと考えられた。

TuMV および YoMV は nCBP 以外の eIF4E アイソフォームを利用するのであろうか。これまでに、TuMV は eIFiso4E を欠損したシロイヌナズナに感染できないことから、eIFiso4E を特異的に利用していると考えられている (Lellis et al., 2002; Nicaise et al., 2007)。TuMV のゲノム RNA の 5'末端にはキャップ構造の代わりにウイルスタンパク質 VPg (viral protein genome linked) が結合していること (表 4.1)、および VPg が eIFiso4E と直接結合することからキャップ構造の代替として VPg が機能する可能性が考えられている (Mäkinen and Hafrén, 2014)。一方、TuMV は eIF4E を欠損したシロイヌナズナに野生型植物と同等に全身感染したことから、TuMV は eIF4E を特異的に利用していないと考えられる (Gallois et al., 2010)。

Tobamovirus 属ウイルスのゲノム RNA の 5'末端にはキャップ構造が存在すること (Keith and Fraenkel-Conrat, 1975; Zimmermann, 1975; Efimov et al., 2001) を考えると、*Tobamovirus* 属ウイルスが翻訳開始因子を利用して感染している可能性は高いであろう。YoMV と近縁な *Tobamovirus* 属ウイルスである tobacco mosaic virus (TMV) の感染と翻訳開始因子の関係性については、Hwang らによる報告がある。同氏らは、eIF4E または nCBP を発現抑制した *N. benthamiana* における TMV の蓄積量を評価し、ベクターコントロールと同等であることを示している (Hwang et al., 2013)。eIFiso4E の発現抑制については実験が行われておらず、TMV は eIFiso4E を特異的に利用する可能性は残されている。しかしながら、*Tobamovirus* 属ウイルスのウイルスタンパク質の翻訳に際して、複数の翻訳開始因子が重複して機能する可能性もある。これらの可能性を検証するためには、eIFiso4E を欠損した

シロイヌナズナにおける YoMV の蓄積量評価や、RNA サイレンシングを用いた複数の eIF4E アイソフォームの発現抑制系を用いた解析が重要である。

4.4. PIAMV が *ncbp* 変異体に全身感染する機構

第 2 章の解析で、*ncbp* 変異体では野生型植物と比べて PIAMV の全身感染が遅延することが明らかになった。また、3.3.1.項の解析で、*ncbp* 変異体では PIAMV の細胞間移行が遅延することが確認された。これらの結果は、nCBP が存在しない条件では遅延するものの、PIAMV は隣接細胞へ移行し、感染を拡大することが可能であることを示している。*ncbp* 変異体で PIAMV が全身感染した原因として、*ncbp* 変異体でも TGB2 および TGB3 が微量に蓄積していたことがあげられるだろう (図 3.6, 図 3.8)。nCBP が存在しない条件で TGB2 および TGB3 が蓄積したのはどのような機構によるものであろうか。このような機構の一つとして、nCBP と機能的に重複した因子が存在する可能性が考えられる。

既報で、CMV の移行タンパク質の翻訳に eIF4E が関与することが示されている (Yoshii et al., 2004)。eIF4E 欠損シロイヌナズナでは、CMV の移行タンパク質の蓄積量が野生型植物と比べて顕著に減少する (Yoshii et al., 2004)。興味深いことに、eIF4E 欠損シロイヌナズナに CMV は全身感染することができる (Yoshii et al., 1998)。CMV のウイルス RNA の 5' 末端にはキャップ構造が存在することから、他の eIF4E アイソフォームが eIF4E の機能を部分的に相補することができたのだろう。その結果、eIF4E 欠損変異体でも移行タンパク質が蓄積し、ウイルスが遅延しつつも全身感染することができたと考えられる。同様に、PIAMV の TGB2 および TGB3 の蓄積促進にも eIF4E もしくは eIFiso4E が関わる可能性が考えられる。しかしながら、TGB2 および TGB3 の翻訳鋳型となるサブゲノム RNA2 にキャップ構造が存在するか否かは不明であることから、eIF4E アイソフォーム以外の因子が関

与する可能性も考えられる。今後の解析によって *ncbp* 変異体で TGB2 および TGB3 が微量に蓄積した機構が明らかになることが期待される。

4.5. *nCBP* 遺伝子の抵抗性遺伝子資源としての有用性

一般に、植物の因子を欠損させた変異体では、生育に異常が生じる可能性がある (Schepetilnikov et al., 2011; Xiong and Wang, 2013; Hashimoto et al., 2016)。例えば、TuMV の感染に必須なシロイヌナズナの因子として SUMO-conjugating enzyme 1 (SCE1) が報告されているが、SCE1 を欠損したシロイヌナズナは致死となる (Xiong and Wang, 2013)。対照的に、単一の eIF4E アイソフォームを欠損したシロイヌナズナでは、実験室での生育不良は観察されていない (Duprat et al., 2002; Lellis et al., 2002; Reinbold et al., 2013; Patrick et al., 2014)。これは、残りの eIF4E アイソフォームが重複して機能するためであると考えられている (Duprat et al., 2002; Lellis et al., 2002; Reinbold et al., 2013; Patrick et al., 2014)。したがって、eIF4E アイソフォームを欠損させる戦略は生育上の表現型が問題にならないと考えられ、実用化につながる可能性が高い。実際に、eIF4E アイソフォームが欠損した品種は、*Hordeum vulgare* (Kanyuka et al., 2004; Kanyuka et al., 2005)、*Capsicum annuum* (Moury et al., 2004)、*Cucumis melo* (Diaz et al., 2004; Nieto et al., 2006)、*Lactuca sativa* (Nicaise et al., 2003)、*Pisum sativum* (Gao et al., 2004) および *Solanum hirsutum* (Ruffel et al., 2005) などで実用化されている。

本論文の結果、*nCBP* を欠損させることで TGB 型の移行タンパク質を有する *Alphaflexivirus* 科および *Betaflexivirus* 科ウイルスの感染を阻害することが可能であることが明らかになった。*nCBP* を欠損したシロイヌナズナは野生型シロイヌナズナと同等に生育したことから、*ncbp* 変異体では eIF4E もしくは eIFiso4E がその機能を相補していると推

測される。したがって、nCBP を欠損させるという戦略によって、植物体の生育を損なうことなく *Alphaflexivirus* 科および *Betaflexivirus* 科ウイルスに対して抵抗性を示す植物の作出が可能であると考えられる。

近年、TALEN や CRISPR などのゲノム編集技術によって人為的に植物の特定の遺伝子に変異を導入することが可能となった。実際に、これらの技術を用いて、植物ウイルスに対して抵抗性を有する植物の作出が行われている (Chandrasekaran et al., 2016; Pyott et al., 2016)。将来的にはこれらの技術を活用し nCBP を欠損させた作物が作出されることで、*Alphaflexivirus* 科および *Betaflexivirus* 科ウイルスの被害が軽減されることに期待したい。

4.6. eIF4E アイソフォームは普遍的に植物ウイルスの感染に関わるか

劣性抵抗性遺伝子の機能解析によって植物ウイルスの感染戦略についての理解を深めることが可能となる。本章では、PIAMV と eIF4E アイソフォームの関わりを中心として、植物ウイルスが eIF4E アイソフォームを普遍的に利用する可能性について考察する。

植物ウイルス RNA からのウイルスタンパク質の翻訳に際しては、植物ウイルスは宿主のリボソームを利用しなければならない。植物の mRNA 上にリボソームがリクルートされるためには、eIF4E アイソフォームをはじめとした翻訳開始因子が mRNA の 5'末端で機能する必要がある。すなわち、ウイルスはリボソームのみならず、リボソームのリクルートに関与する翻訳開始因子も利用していると推察される。

eIF4E アイソフォームを利用する際には、植物ウイルスは①一つの eIF4E アイソフォームを特異的に利用する場合と②複数の eIF4E アイソフォームを重複して利用する場合があると考えられる。本論文の 2.3.1.項で eIF4E アイソフォームを欠損したシロイヌナズナに PIAMV を接種した結果、*eif4e* 変異体および *eifiso4e* 変異体では野生型植物と同等に PIAMV

が感染したが、*ncbp* 変異体における PIAMV の蓄積量は野生型植物と比べて有意に減少した。この結果から、PIAMV が nCBP を①特異的に利用していると考えられた。さらに、3.3.4. 項の解析の結果、*ncbp* 変異体では PIAMV にコードされるウイルスタンパク質のうち、TGB2 および TGB3 の蓄積量が顕著に減少した。したがって、PIAMV は eIF4E アイソフォームのうち、nCBP を特異的に利用して TGB2 および TGB3 を蓄積させていることが示唆された。一方、*ncbp* 変異体においても、RdRp、TGB1 および CP は野生型植物と同等に蓄積した。PIAMV のゲノム RNA にはキャップ構造が存在することをふまえると(Sonenberg et al., 1978; Dolja et al., 1987)、RdRp の翻訳には eIF4E、eIFiso4E および nCBP が②重複して機能すると推測される。つまり、PIAMV は3種類の eIF4E アイソフォームを全て利用している可能性が考えられる。

4.2.項で述べたように、植物ウイルスはゲノムの末端構造に関わらず eIF4E アイソフォームを特異的に利用していることが明らかになってきた (表 4.1)。しかしながら、植物ウイルスが eIF4E アイソフォームを重複して利用する可能性については研究がほとんどなされていない。*Virgavirus* 科ウイルスや *Bromovirus* 科ウイルスのように、キャップ構造を有する植物ウイルスは多く存在することから、eIF4E アイソフォームを重複して利用する例は多いと推察される。今後の解析によって、eIF4E、eIFiso4E および nCBP が個々の植物ウイルスの感染にどのように関与するのかが明らかにされることで、植物ウイルスの感染戦略の理解が進むと考えられる。

摘要

一般に、植物ウイルスはゲノム中に限られた数のタンパク質しかコードしておらず、その少数の遺伝子産物で宿主植物に感染するためには、多数の宿主の因子を利用しなければならない。この宿主因子が欠損もしくは変異した植物では、ウイルスの増殖もしくは感染領域の拡大が阻害され、植物はウイルスに対して抵抗性を示す。このような、宿主因子の欠損によるウイルス抵抗性は劣性遺伝することから劣性抵抗性と呼ばれ、多くのウイルス抵抗性品種に見出されている。すなわち、宿主因子の特定はウイルス抵抗性作物を作出するための遺伝子資源を増やすことにつながる。また、宿主因子の機能を解析することで、ウイルスの感染戦略について理解を深めることが可能となる。

これまでにマッピングされた劣性抵抗性遺伝子の多くは翻訳開始因子 eukaryotic translation initiation factor (eIF) 4E もしくはそのアイソフォームである eIFiso4E をコードする。eIF4E および eIFiso4E は mRNA のキャップ構造に結合する因子であり、mRNA からのタンパク質の翻訳の開始に関わる。eIF4E が欠損もしくは変異した植物は *Potyvirus* 属ウイルス、*Bymovirus* 属ウイルス、*Cucumovirus* 属ウイルスおよび *Carmovirus* 属ウイルスに対して抵抗性となり、eIFiso4E が欠損もしくは変異した植物は *Potyvirus* 属ウイルスに抵抗性となる。植物の eIF4E アイソフォームとしては、eIF4E、eIFiso4E に加えて、novel cap binding protein (nCBP) が存在することが知られていたが、nCBP がウイルスの感染に関わるか否かは明らかでなかった。

Alphaflexivirus 科 *Potexvirus* 属ウイルスはプラス鎖 RNA をゲノムとし、その 5'末端にはキャップ構造が、3'末端にはポリ A 配列が存在する。*Potexvirus* 属には、ラン科植物にモザイク症状を引き起こす cymbidium mosaic virus (CymMV) や、ユリ科植物に壊死症状をもたらす *plantago asiatica* mosaic virus (PIAMV) などが含まれる。ラン科やユリ科の植物は榮

養繁殖により株を増やすことからウイルスが一度感染すると被害が大きく、これらの *Potexvirus* 属ウイルスに対する抵抗性遺伝子の探索が急務となっている。しかしながら、eIF4E アイソフォームの欠損による抵抗性が *Potexvirus* 属ウイルスに対して有効であるか否かは明らかでなかった。

Alphaflexivirus 科および Betaflexivirus 科ウイルスに対する劣性抵抗性遺伝子 *nCBP* の同定

Potexvirus 属ウイルスの感染に eIF4E アイソフォームが関わるか否かを検証するために、eIF4E アイソフォームを欠損させたシロイヌナズナ (*eif4e* 変異体、*eifiso4e* 変異体、*ncbp* 変異体) に GFP を発現する PIAMV (PIAMV-GFP) を機械接種し、4 日後に接種葉を観察した。その結果、PIAMV-GFP の感染に伴い形成される蛍光斑の大きさは、*eif4e* 変異体、*eifiso4e* 変異体では野生型植物と同等であったが、*ncbp* 変異体では顕著に低下した。また、定量 RT-PCR 法により接種葉におけるウイルス RNA の蓄積量を解析したところ、*ncbp* 変異体におけるウイルス RNA の蓄積量は野生型植物と比較して有意に減少した。

さらに、*ncbp* 変異体に PIAMV が全身感染するか否かを明らかにするために、*ncbp* 変異体および野生型植物に PIAMV-GFP を接種し 4 週間後に PIAMV-GFP の検出を試みた。RT-PCR 法により解析したところ、*ncbp* 変異体の上葉で PIAMV-GFP が検出される頻度が野生型植物に比べて低下しており、検出された場合にもその蓄積量は野生型植物に比べて有意に減少していた。したがって、*ncbp* 変異体では PIAMV の全身感染が遅延すると考えられた。

ncbp 変異体におけるウイルスの感染阻害が *nCBP* の欠損に起因することを示すために、*ncbp* 変異体に *nCBP* 遺伝子を形質転換した相補系統を作出した。相補系統および野生型植物に PIAMV-GFP を機械接種し、4 日後に観察したところ、蛍光斑の大きさおよびウイルス

RNA の蓄積量が野生型と同程度まで回復した。さらに相補系統および野生型植物に PIAMV-GFP を機械接種し 3 週間後に上葉から PIAMV-GFP RNA を検出したところ、全ての相補系統から検出された。これらの結果から、nCBP の欠損により PIAMV の感染が阻害されることが明らかになった。

次に、nCBP の欠損によって感染が阻害されるウイルスを明らかにするために、様々な植物ウイルスを *ncbp* 変異体、相補系統および野生型植物に機械接種し 4 日後に接種葉における蓄積量を解析した。その結果、*Alphaflexivirus* 科 *Potexvirus* 属に属する *Alternanthera mosaic virus* および CymMV、*Alphaflexivirus* 科 *Lolavirus* 属に属する *Lolium latent virus*、*Betaflexivirus* 科 *Carlavirus* 属に属する *Potato virus M* の蓄積量が *ncbp* 変異体で野生型植物と比較して有意に減少し、相補系統で回復した。これらの結果から、nCBP の欠損によって、*Alphaflexivirus* 科および *Betaflexivirus* 科ウイルスの感染が阻害されることが明らかになった。一方、*Potyvirus* 科 *Potyvirus* 属に属する *Turnip mosaic virus* および *Virgavirus* 科 *Tobamovirus* 属に属する *Youcai mosaic virus* の *ncbp* 変異体における蓄積量は野生型植物と同等であった。

nCBP の欠損による *Potexvirus* 属ウイルスの感染阻害機構の解析

Potexvirus 属ウイルスの感染における nCBP の役割を明らかにすることを目的とした。まず、*ncbp* 変異体で PIAMV-GFP の全身移行が阻害された結果を踏まえ、*ncbp* 変異体で PIAMV の移行が阻害されているか否かを調べた。*ncbp* 変異体および野生型植物に PIAMV-GFP をボンバードメント法により接種し、ウイルスの広がりを経時的に観察した。その結果、接種 12 時間後、24 時間後、36 時間後のいずれの時点でも *ncbp* 変異体における感染斑の面積が野生型植物に比べて有意に低下し、*ncbp* 変異体では細胞間移行が阻害さ

れていることが明らかになった。

次に、*ncbp* 変異体で PIAMV の単細胞での増殖が阻害されているか否かについて解析を行った。*ncbp* 変異体および野生型植物から調整したプロトプラストに PIAMV を接種し、3 日後に抽出した全 RNA を用いてノーザンブロット解析を行った。その結果、*ncbp* 変異体におけるゲノム RNA の蓄積量は野生型植物と同等であった。したがって、単細胞レベルのゲノム複製に nCBP は関与しないことが明らかになった。

最後に、細胞間移行に関わるウイルスタンパク質の蓄積量が、*ncbp* 変異体で野生型植物に比べて低下しているか否かについて解析した。*ncbp* 変異体および野生型植物に PIAMV-GFP をアグロインフィルトレーション法により接種し、4 日後に接種葉から抽出した全タンパク質を用いてウエスタンブロット解析を行った。その結果、PIAMV のゲノム RNA にコードされる 5 つのタンパク質のうち、移行タンパク質 triple gene block protein (TGB) 2 および TGB3 の蓄積量が *ncbp* 変異体で野生型植物と比べて顕著に低下した。一方、その他の 3 つのウイルスタンパク質の蓄積量は *ncbp* 変異体と野生型植物で同等であった。TGB2 および TGB3 は *Potexvirus* 属ウイルスの細胞間移行に必須であることを考えると、*ncbp* 変異体で PIAMV の細胞間移行が阻害された結果は、TGB2 および TGB3 の蓄積量が低下したことに起因すると推察された。

本研究では、*Alphaflexivirus* 科および *Betaflexivirus* 科ウイルスの感染に nCBP が関わることを明らかにした。また、nCBP は *Potexvirus* 属ウイルスの移行タンパク質 TGB2 および TGB3 の蓄積を促進することでウイルスの細胞間移行に寄与していることが示唆された。本研究で解析した *Alphaflexivirus* 科および *Betaflexivirus* 科ウイルスはいずれも TGB タイプの移行タンパク質を有することから、これらのウイルスの TGB2 および TGB3 の蓄積にも

nCBP が関わりと推測される。今後は、nCBP を欠損させることで、*Alphaflexivirus* 科および *Betaflexivirus* 科ウイルスに抵抗性を有する作物の作出が期待される。

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 難波成任教授には最高の研究環境を与えていただきました。また、ゼミやミーティングを通して、研究の進め方や考え方など、研究者としてのあり方についてご指導いただきました。衷心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、橋本将典博士研究員（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 植物医科学研究室）、山次康幸准教授（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）、薦田優香講師（酪農学園大学 循環農学類、元東京大学大学院 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）には、技術的な問題や研究の方向性など、様々なことを議論させていただきました。また、本論文の執筆にあたっても有益な助言を多数いただきました。厚く御礼申し上げます。

植物病理学研究室、植物医科学研究室の皆様には、私の足りないところを幾度となく補っていただきました。また、皆様と研究の大変さや面白さを分かち合うことで、6年間に渡って研究生活に打ち込むことができました。特に、同期の二條貴通氏、北沢優悟氏とはお互いに切磋琢磨することで多大な刺激を頂きました。改めて感謝申し上げます。

同研究室職員の野原こずえ様には実験を進める上で多大な支援をいただきました。中川弥生様には研究が滞りなく進むよう事務手続き全般について援助していただきました。深く感謝申し上げます。

本研究で使用した LoLV は United States Department of Agriculture の John Hammond 博士より、*eifiso4e* 変異体の種子は The University of Texas at Austin の Karen S. Browning 博士より、それぞれ分譲していただきました。心より感謝申し上げます。

最後に、様々な場面で私の研究活動を支えてくださった両親、祖父母および妹に感謝の意を表したいと思います。

略語一覧

ABRC	Arabidopsis Biological Resource Center
AlkB	alkylated DNA repair protein
AltMV	alternanthera mosaic virus
BaMMV	barley mild mosaic virus
BaYMV	barley yellow mosaic virus
BCMV	bean common mosaic virus
BYMV	bean yellow mosaic virus
ChiVMV	chilli veinal mottle virus
CIYVV	clover yellow vein virus
CMV	cucumber mosaic virus
Col-0	Columbia-0 (シロイヌナズナエコタイプ)
CP	coat protein
CRP	cystein rich protein
CVYV	cucumber vein yellowing virus
CymMV	cymbidium mosaic virus
eIF	eukaryotic translation initiation factor
ER	endoplasmic reticulum
ERV	ecuadorian rocoto virus
GFP	green fluorescent protein
Hel	helicase
HR	hypersensitive response
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
JAX1	jacalin-type lectin required for potexvirus resistance 1
LMV	lettuce mosaic virus
LoLV	lolium latent virus
MET	methyltransferase
MNSV	melon necrotic spot virus
MP	movement protein
MWMV	moroccan watermelon mosaic virus
NB-LRR	nucleotide binding leucine rich repeat
NCBI	National Center for Biotechnology Information

nCBP	novel cap binding protein
ORF	open reading frame
PABP	polyA binding protein
PD	plasmodesmata
PepMoV	pepper mottle virus
PepSMV	pepper severe mosaic virus
PepYMV	pepper yellow mosaic virus
PIAMV	plantago asiatica mosaic virus
Pol	polymerase
P-Pro	papain-like protease
PPV	plum pox virus
PsBMV	pea seed-borne mosaic virus
PVM	potato virus M
PVMV	pepper vein mottling virus
PVX	potex virus X
PVY	potato virus Y
R	resistance
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase
RISC	RNA-induced silencing complex
RT-PCR	reverse transcription PCR
SCE1	SUMO-conjugating enzyme 1
SEL	size exclusion limit
siRNA	small interfering RNA
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
T-DNA	transferred DNA
TEV	tobacco etch virus
TGB	triple-gene-block protein
Ti プラスミド	tumor-inducing plasmid
TMV	tobacco mosaic virus
TuMV	turnip mosaic virus
UTR	untranslated region
VPg	viral protein genome linked
VRC	viral replication complex

YoMV	youcai mosaic virus
ZYMV	zucchini yellow mosaic virus

引用文献

- Andrade, M., Abe, Y., Nakahara, K.S. and Uyeda, I.** (2009) The *cyv-2* resistance to *Clover yellow vein virus* in pea is controlled by the eukaryotic initiation factor 4E. *J. Gen. Plant Pathol.* 75, 241-249.
- Arroyo, R., Soto, M.J., Martinez-Zapater, J. and Ponz, F.** (1996) Impaired cell-to-cell movement of potato virus y in pepper plants carrying the *y^a* (*pr2¹*) resistance gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9, 314-318.
- Ashby, J.A., Stevenson, C.E., Jarvis, G.E., Lawson, D.M. and Maule, A.J.** (2011) Structure-based mutational analysis of eIF4E in relation to *sbml* resistance to pea seed-borne mosaic virus in pea. *PLoS ONE* 6, e15873.
- Ayme, V., Petit-Pierre, J., Souche, S., Palloix, A. and Moury, B.** (2007) Molecular dissection of the potato virus Y VPg virulence factor reveals complex adaptations to the *pvr2* resistance allelic series in pepper. *J. Gen. Virol.* 88, 1594-1601.
- Ayme, V., Souche, S., Caranta, C., Jacquemond, M., Chadoeuf, J., Palloix, A. and Moury, B.** (2006) Different mutations in the genome-linked protein VPg of *Potato virus Y* confer virulence on the *pvr2³* resistance in pepper. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19, 557-563.
- Bamunusinghe, D., Hemenway, C.L., Nelson, R.S., Sanderfoot, A.A., Ye, C.M., Silva, M.A., Payton, M. and Verchot-Lubicz, J.** (2009) Analysis of potato virus X replicase and TGBp3 subcellular locations. *Virology* 393, 272-285.
- Biffen, R.H.** (1912) Studies in the Inheritance of Disease Resistance. II *J. Agric. Sci.* 4, 421-429.
- Brault, V., Bergdoll, M., Mutterer, J., Prasad, V., Pfeffer, S., Erdinger, M.,**

- Richards, K.E. and Ziegler-Graff, V.** (2003) Effects of point mutations in the major capsid protein of beet western yellows virus on capsid formation, virus accumulation, and aphid transmission. *J. Virol.* 77, 3247-3256.
- Bruun-Rasmussen, M., Moller, I.S., Tulinius, G., Hansen, J.K., Lund, O.S. and Johansen, I.E.** (2007) The same allele of translation initiation factor 4E mediates resistance against two *Potyvirus* spp. in *Pisum sativum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 1075-1082.
- Bush, M.S., Hutchins, A.P., Jones, A.M., Naldrett, M.J., Jarmolowski, A., Lloyd, C.W. and Doonan, J.H.** (2009) Selective recruitment of proteins to 5' cap complexes during the growth cycle in Arabidopsis. *Plant J.* 59, 400-412.
- Cavatorta, J., Perez, K.W., Gray, S.M., Van Eck, J., Yeam, I. and Jahn, M.** (2011) Engineering virus resistance using a modified potato gene. *Plant Biotechnol. J.* 9, 1014-1021.
- Chandrasekaran, J., Brumin, M., Wolf, D., Leibman, D., Klap, C., Pearlsman, M., Sherman, A., Arazi, T. and Gal-On, A.** (2016) Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol. Plant Pathol.* 17, 1140-1153.
- Chapman, S., Hills, G., Watts, J. and Baulcombe, D.** (1992) Mutational analysis of the coat protein gene of potato virus X: effects on virion morphology and viral pathogenicity. *Virology* 191, 223-230.
- Charron, C., Nicolai, M., Gallois, J.L., Robaglia, C., Moury, B., Palloix, A. and Caranta, C.** (2008) Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *Plant J.* 54, 56-68.
- Chiu, W., Niwa, Y., Zeng, W., Hirano, T., Kobayashi, H. and Sheen, J.** (1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr. Biol.* 6, 325-330.

- Chou, Y.L., Hung, Y.J., Tseng, Y.H., Hsu, H.T., Yang, J.Y., Wung, C.H., Lin, N.S., Meng, M., Hsu, Y.H. and Chang, B.Y.** (2013) The stable association of virion with the triple-gene-block protein 3-based complex of *Bamboo mosaic virus*. *PLoS Pathog.* 9, e1003405.
- Díaz, J.A., Nieto, C., Moriones, E., Truniger, V. and Aranda, M.A.** (2004) Molecular characterization of a *Melon necrotic spot virus* strain that overcomes the resistance in melon and nonhost plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 668-675.
- Díaz-Pendón, J.A., Truniger, V., Nieto, C., García-Mas, J., Bendahmane, A. and Aranda, M.A.** (2004) Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. *Mol. Plant Pathol.* 5, 223-233.
- Dolja, V.V., Grama, D.P., Morozov, S.Y. and Atabekov, J.G.** (1987) Potato virus X-related single- and double-stranded RNAs: Characterization and identification of terminal structures. *FEBS Lett.* 214, 308-312.
- Dreher, T.W. and Miller, W.A.** (2006) Translational control in positive strand RNA plant viruses. *Virology* 344, 185-197.
- Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, K.S. and Robaglia, C.** (2002) The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant J.* 32, 927-934.
- Efimov, V.A., Chakhmakhcheva, O.G., Archdeacon, J., Fernandez, J.M., Fedorkin, O.N., Dorokhov Y.L. and Atabekov, J.G.** (2001) Detection of the 5'-cap structure of messenger RNAs with the use of the cap-jumping approach. *Nucleic Acids Res.* 29, 4751-4759.
- Fraser, R.S.S.** (1992) The genetics of plant-virus interactions: implications for plant

breeding. *Euphytica* 63, 175-185.

Gallois, J.L., Charron, C., Sánchez, F., Pagny, G., Houvenaghel, M.C., Moretti, A., Ponz, F., Revers, F., Caranta, C. and German-Retana, S. (2010) Single amino acid changes in the turnip mosaic virus viral genome-linked protein (VPg) confer virulence towards *Arabidopsis thaliana* mutants knocked out for eukaryotic initiation factors eIF(iso)4E and eIF(iso)4G. *J. Gen. Virol.* 91, 288-293.

Gao, Z., Johansen, E., Eyers, S., Thomas, C.L., Noel Ellis, T.H. and Maule, A.J. (2004) The potyvirus recessive resistance gene, *sbm1*, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. *Plant J.* 40, 376-385.

German-Retana, S., Walter, J., Doublet, B., Roudet-Tavert, G., Nicaise, V., Lecampion, C., Houvenaghel, M.C., Robaglia, C., Michon, T. and Le Gall, O. (2008) Mutational analysis of plant cap-binding protein eIF4E reveals key amino acids involved in biochemical functions and potyvirus infection. *J. Virol.* 82, 7601-7612.

Greenberg, J.T. and Ausubel, F.M. (1993) *Arabidopsis* mutants compromised for the control of cellular damage during pathogenesis and aging. *Plant J.* 4, 327-341.

Hagiwara, Y., Komoda, K., Yamanaka, T., Tamai, A., Meshi, T., Funada, R., Tsuchiya, T., Naito, S. and Ishikawa, M. (2003) Subcellular localization of host and viral proteins associated with tobamovirus RNA replication. *EMBO J.* 22, 344-353.

Hanssen, I.M. and Thomma, B.P. (2010) *Pepino mosaic virus*: a successful pathogen that rapidly evolved from emerging to endemic in tomato crops. *Mol. Plant Pathol.* 11, 179-189.

- Hart, J.P. and Griffiths, P.D.** (2013) A series of eIF4E alleles at the *Bc-3* locus are associated with recessive resistance to *Clover yellow vein virus* in common bean. *Theor. Appl. Genet.* 126, 2849-2863.
- Hashimoto, M., Neriya, Y., Keima, T., Iwabuchi, N., Koinuma, H., Hagiwara-Komoda, Y., Ishikawa, K., Himeno, M., Maejima, K., Yamaji, Y. and Namba, S.** (2016) EXA1, a GYF domain protein, is responsible for loss-of-susceptibility to plantago asiatica mosaic virus in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 88, 120-131.
- Himeno, M., Maejima, K., Komatsu, K., Ozeki, J., Hashimoto, M., Kagiwada, S., Yamaji, Y. and Namba, S.** (2010) Significantly low level of small RNA accumulation derived from an encapsidated mycovirus with dsRNA genome. *Virology* 396, 69-75.
- Hipper, C., Monsion, B., Bortolamiol-Bécet, D., Ziegler-Graff, V. and Brault, V.** (2014) Formation of virions is strictly required for turnip yellows virus long-distance movement in plants. *J. Gen. Virol.* 95, 496-505.
- Höfgen, R. and Willmitzer, L.** (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res.* 16, 9877.
- Hofinger, B.J., Russell, J.R., Bass, C.G., Baldwin, T., dos Reis, M., Hedley, P.E., Li, Y., Macaulay, M., Waugh, R., Hammond-Kosack, K.E. and Kanyuka, K.** (2011) An exceptionally high nucleotide and haplotype diversity and a signature of positive selection for the *eIF4E* resistance gene in barley are revealed by allele mining and phylogenetic analyses of natural populations. *Mol. Ecol.* 20, 3653-3668.
- Howard, A.R., Heppler, M.L., Ju, H.J., Krishnamurthy, K., Payton, M.E. and Verchot-Lubicz, J.** (2004) *Potato virus X* TGBp1 induces plasmodesmata gating and moves between cells in several host species whereas CP moves only in *N. benthamiana* leaves. *Virology* 328, 185-197.

- Hwang, J., Oh, C.S. and Kang, B.C.** (2013) Translation elongation factor 1B (eEF1B) is an essential host factor for *Tobacco mosaic virus* infection in plants. *Virology* 439, 105-114.
- Ibiza, V.P., Cañizares, J. and Nuez, F.** (2010) EcoTILLING in *Capsicum* species: searching for new virus resistances. *BMC Genomics* 11, 631.
- Iwabuchi, N., Yoshida, T., Yusa, A., Nishida, S., Tanno, K., Keima, T., Nijo, T., Yamaji, Y. and Namba, S.** (2016) Complete genome sequence of *Alternanthera mosaic virus*, isolated from *Achyranthes bidentata* in Asia. *Genome Announc.* 4, e00020-16.
- Iwasaki, S., Takeda, A., Motose, H. and Watanabe, Y.** (2007) Characterization of *Arabidopsis* decapping proteins AtDCP1 and AtDCP2, which are essential for post-embryonic development. *FEBS Lett.* 581, 2455-2459.
- Jenner, C.E., Nellist, C.F., Barker, G.C. and Walsh, J.A.** (2010) Turnip mosaic virus (TuMV) is able to use alleles of both *eIF4E* and *eIF(iso)4E* from multiple loci of the diploid *Brassica rapa*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23, 1498-1505.
- Jin, J.B., Kim, Y.A., Kim, S.J., Lee, S.H., Kim, D.H., Cheong, G.W. and Hwang, I.** (2001) A new dynamin-like protein, ADL6, is involved in trafficking from the *trans*-Golgi network to the central vacuole in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 1511-1526.
- Johansen, L.K. and Carrington, J.C.** (2001) Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Physiol.* 126, 930-938.
- Joshi, B., Lee, K., Maeder, D.L. and Jagus, R.** (2005) Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evol. Biol.* 5, 48.

- Ju, H.J., Samuels, T.D., Wang, Y.S., Blancaflor, E., Payton, M., Mitra, R., Krishnamurthy, K., Nelson, R.S. and Verchot-Lubicz, J.** (2005) The potato virus X TGBp2 movement protein associates with endoplasmic reticulum-derived vesicles during virus infection. *Plant Physiol.* 138, 1877-1895.
- Kang, B.C., Yeam, I., Frantz, J.D., Murphy, J.F. and Jahn, M.M.** (2005) The *pvr1* locus in *Capsicum* encodes a translation initiation factor eIF4E that interacts with *Tobacco etch virus* VPg. *Plant J.* 42, 392-405.
- Kang, B.C., Yeam, I. and Jahn, M.M.** (2005) Genetics of plant virus resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 581-621.
- Kanyuka, K., Druka, A., Caldwell, D.G., Tymon, A., McCallum, N., Waugh, R. and Adams, M.J.** (2005) Evidence that the recessive bymovirus resistance locus *rym4* in barley corresponds to the eukaryotic translation initiation factor 4E gene. *Mol. Plant. Pathol.* 6, 449-458.
- Kanyuka, K., McGrann, G., Alhudaib, K., Hariri, D. and Adams, M.J.** (2004) Biological and sequence analysis of a novel European isolate of *Barley mild mosaic virus* that overcomes the barley *rym5* resistance gene. *Arch. Virol.* 149, 1469-1480.
- Kawaguchi, R. and Bailey-Serres, J.** (2002) Regulation of translational initiation in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 460-465.
- Keith, J. and Fraenkel-Conrat, H.** (1975) Tobacco mosaic virus RNA carries 5'-terminal triphosphorylated guanosine blocked by 5'-linked 7-methylguanosine. *FEBS Lett.* 57, 31-33.
- Kim, J., Kang, W.H., Hwang, J., Yang, H.B., Dosun, K., Oh, C.S. and Kang, B.C.** (2014) Transgenic *Brassica rapa* plants over-expressing eIF(iso)4E variants

show broad-spectrum *Turnip mosaic virus* (TuMV) resistance. *Mol. Plant Pathol.* 15, 615-626.

Koh, K.W., Lu, H.C. and Chan, M.T. (2014) Virus resistance in orchids. *Plant Sci.* 228, 26-38.

Komatsu, K., Hashimoto, M., Maejima, K., Shiraishi, T., Neriya, Y., Miura, C., Minato, N., Okano, Y., Sugawara, K., Yamaji, Y. and Namba, S. (2011) A necrosis-inducing elicitor domain encoded by both symptomatic and asymptomatic *Plantago asiatica mosaic virus* isolates, whose expression is modulated by virus replication. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24, 408-420.

Komatsu, K., Yamaji, Y., Ozeki, J., Hashimoto, M., Kagiwada, S., Takahashi, S. and Namba, S. (2008) Nucleotide sequence analysis of seven Japanese isolates of *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV): a unique potexvirus with significantly high genomic and biological variability within the species. *Arch. Virol.* 153, 193-198.

Konecna, E., Safarova, D., Navratil, M., Hanacek, P., Coyne, C., Flavell, A., Vishnyakova, M., Ambrose, M., Redden, R. and Smykal, P. (2014) Geographical gradient of the *eIF4E* alleles conferring resistance to potyviruses in pea (*Pisum*) germplasm. *PLoS ONE* 9, e90394.

Kropiwnicka, A., Kuchta, K., Lukaszewicz, M., Kowalska, J., Jemielity, J., Ginalska, K., Darzynkiewicz, E. and Zuberek J. (2015) Five eIF4E isoforms from *Arabidopsis thaliana* are characterized by distinct features of cap analogs binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 456, 47-52.

Kuhne, T., Shi, N., Proeseler, G., Adams, M.J. and Kanyuka, K. (2003) The ability of a bymovirus to overcome the *rym4*-mediated resistance in barley correlates with a codon change in the VPg coding region on RNA1. *J. Gen. Virol.* 84, 2853-2859.

- Kumar, D., Kumar, R., Hyun, T.K. and Kim, J.Y.** (2015) Cell-to-cell movement of viruses via plasmodesmata. *J. Plant Res.* 128, 37-47.
- Lam, E., Kato, N. and Lawton, M.** (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411, 848-853.
- Lellis, A.D., Kasschau, K.D., Whitham, S.A. and Carrington, J.C.** (2002) Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Curr. Biol.* 12, 1046-1051.
- Lezzhov, A.A., Gushchin, V.A., Lazareva, E.A., Vishnichenko, V.K., Morozov, S.Y. and Solovyev, A.G.** (2015) Translation of the shallot virus X TGB3 gene depends on non-AUG initiation and leaky scanning. *J. Gen. Virol.* 96, 3159-3164.
- Ling, K.S., Harris, K.R., Meyer, J.D., Levi, A., Guner, N., Wehner, T.C., Bendahmane, A. and Havey, M.J.** (2009) Non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the watermelon *eIF4E* gene are closely associated with resistance to *Zucchini yellow mosaic virus*. *Theor. Appl. Genet.* 120, 191-200.
- Mazier, M., Flamain, F., Nicolai, M., Sarnette, V. and Caranta, C.** (2011) Knock-down of both *eIF4E1* and *eIF4E2* genes confers broad-spectrum resistance against potyviruses in tomato. *PLoS ONE* 6, e29595.
- Mäkinen, K. and Hafrén, A.** (2014) Intracellular coordination of potyviral RNA functions in infection. *Front. Plant Sci.* 26, 110.
- Marandel, G., Salava, J., Abbott, A., Candresse, T. and Decroocq, V.** (2009) Quantitative trait loci meta-analysis of *Plum pox virus* resistance in apricot (*Prunus armeniaca* L.): new insights on the organization and the identification of genomic resistance factors. *Mol. Plant Pathol.* 10, 347-360.

- Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H. and Michelmore, R.W. (2003)** Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 809-834.
- Minato, N., Komatsu, K., Okano, Y., Maejima, K., Ozeki, J., Senshu, H., Takahashi, S., Yamaji, Y. and Namba, S. (2014)** Efficient foreign gene expression *in planta* using a plantago asiatica mosaic virus-based vector achieved by the strong RNA-silencing suppressor activity of TGBp1. *Arch. Virol.* 159, 885-896.
- Miller, W.A. and Koev, G. (2000)** Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. *Virology* 273, 1-8.
- Miras, M., Sempere, R.N., Kraft, J.J., Miller, W.A., Aranda, M.A. and Truniger, V. (2014)** Interfamilial recombination between viruses led to acquisition of a novel translation-enhancing RNA element that allows resistance breaking. *New Phytol.* 202, 233-246.
- Miras, M., Truniger, V., Querol-Audi, J. and Aranda, M.A. (2016)** Analysis of the interacting partners eIF4F and 3'-CITE required for *Melon necrotic spot virus* cap-independent translation. *Mol. Plant Pathol.* doi:10.1111/mp.12422
- Moury, B., Janzac, B., Ruellan, Y., Simon, V., Ben Khalifa, M., Fakhfakh, H., Fabre, F. and Palloix, A. (2014)** Interaction patterns between *Potato virus Y* and eIF4E-mediated recessive resistance in the *Solanaceae*. *J. Virol.* 88, 9799-9807.
- Moury, B., Morel, C., Johansen, E., Guilbaud, L., Souche, S., Ayme, V., Caranta, C., Palloix, A. and Jacquemond, M. (2004)** Mutations in *Potato virus Y* genome-linked protein determine virulence toward recessive resistances in *Capsicum annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 322-329.

- Naderpour, M., Lund, O.S., Larsen, R. and Johansen, E.** (2010) Potyviral resistance derived from cultivars of *Phaseolus vulgaris* carrying *bc-3* is associated with the homozygotic presence of a mutated *eIF4E* allele. *Mol. Plant Pathol.* 11, 255-263.
- Nagy, P.D. and Pogany, J.** (2012) The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 137-149.
- Nellist, C.F., Qian, W., Jenner, C.E., Moore, J.D., Zhang, S., Wang, X., Briggs, W.H., Barker, G.C., Sun, R. and Walsh, J.A.** (2014) Multiple copies of eukaryotic translation initiation factors in *Brassica rapa* facilitate redundancy, enabling diversification through variation in splicing and broad-spectrum virus resistance. *Plant J.* 77, 261-268.
- Newburn, L.R. and White, K.A.** (2015) *Cis*-acting RNA elements in positive-strand RNA plant virus genomes. *Virology* 479-480, 434-443.
- Nicaise, V., Gallois, J.L., Chafiai, F., Allen, L.M., Schurdi-Levraud, V., Browning, K.S., Candresse, T., Caranta, C., Le Gall, O. and German-Retana, S.** (2007) Coordinated and selective recruitment of eIF4E and eIF4G factors for potyvirus infection in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 581, 1041-1046.
- Nicaise, V., German-Retana, S., Sanjuan, R., Dubrana, M.P., Mazier, M., Maisonneuve, B., Candresse, T., Caranta, C. and Le Gall, O.** (2003) The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus *Lettuce mosaic virus*. *Plant Physiol.* 132, 1272-1282.
- Nieto, C., Morales, M., Orjeda, G., Clepet, C., Monfort, A., Sturbois, B., Puigdomènech, P., Pitrat, M., Caboche, M., Dogimont, C., Garcia-Mas, J., Aranda, M.A. and Bendahmane, A.** (2006) An *eIF4E* allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon. *Plant J.* 48, 452-462.

- Nishikiori, M., Mori, M., Dohi, K., Okamura, H., Katoh, E., Naito, S., Meshi, T. and Ishikawa, M.** (2011) A host small GTP-binding protein ARL8 plays crucial roles in tobamovirus RNA replication. *PLoS Pathog.* 7, e1002409.
- 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 broad-spectrum resistance in transgenic *Arabidopsis*. *Phytopathology* 94, 730-736.
- 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. *Plant Cell* 26, 2168-2183.
- Ozeki, J., Hashimoto, M., Komatsu, K., Maejima, K., Himeno, M., Senshu, H., Kawanishi, T., Kagiwada, S., Yamaji, Y. and Namba, S.** (2009) The N-terminal region of the *Plantago asiatica mosaic virus* coat protein is required for cell-to-cell movement but is dispensable for virion assembly. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22, 677-685.
- Patrick, R.M., Mayberry, L.K., Choy, G., Woodard, L.E., Liu, J.S., White, A., Mullen, R.A., Tanavin, T.M., Latz, C.A. and Browning, K.S.** (2014) Two *Arabidopsis* loci encode novel eukaryotic initiation factor 4E isoforms that are functionally distinct from the conserved plant eukaryotic initiation factor 4E. *Plant Physiol.* 164, 1820-1830.
- Perovic, D., Kramer, I., Habekuss, A., Perner, K., Pickering, R., Proeseler, G., Kanyuka, K. and Ordon, F.** (2014) Genetic analyses of BaMMV/BaYMV resistance in barley accession HOR4224 result in the identification of an allele of the translation initiation factor 4e (*Hv-eIF4E*) exclusively effective against *Barley mild mosaic virus* (BaMMV). *Theor. Appl. Genet.* 127, 1061-1071.

- Piron, F., Nicolai, M., Minoia, S., Piednoir, E., Moretti, A., Salgues, A., Zamir, D., Caranta, C. and Bendahmane, A.** (2010) An induced mutation in tomato eIF4E leads to immunity to two potyviruses. *PLoS One* 5, e11313.
- Pyott, D.E., Sheehan, E. and Molnar, A.** (2016) Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free *Arabidopsis* plants. *Mol. Plant Pathol.* 17, 1276-1288.
- Rate, D.N., Cuenca, J.V., Bowman, G.R., Guttman, D.S. and Greenberg, J.T.** (1999) The gain-of-function *Arabidopsis acd6* mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid signaling pathway in controlling cell death, defenses, and cell growth. *Plant Cell* 11, 1695-1708.
- Reddy, D.V., Sudarshana, M.R., Fuchs, M., Rao, N.C. and Thottappilly, G.** (2009) Genetically engineered virus-resistant plants in developing countries: current status and future prospects. *Adv. Virus Res.* 75, 185-220.
- Reinhold, C., Lacombe, S., Ziegler-Graff, V., Scheidecker, D., Wiss, L., Beuve, M., Caranta, C. and Brault, V.** (2013) Closely related poleroviruses depend on distinct translation initiation factors to infect *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26, 257-265.
- Robaglia, C. and Caranta, C.** (2006) Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends Plant Sci.* 11, 40-45.
- Rodriguez-Hernandez, A.M., Gosalvez, B., Sempere, R.N., Burgos, L., Aranda, M.A. and Truniger, V.** (2012) Melon RNA interference (RNAi) lines silenced for *Cm-eIF4E* show broad virus resistance. *Mol. Plant Pathol.* 13, 755-763.
- Rubio, M., Nicolai, M., Caranta, C. and Palloix, A.** (2009) Allele mining in the pepper gene pool provided new complementation effects between *pvr2-eIF4E*

and *pvr6-eIFISO4E* alleles for resistance to pepper veinal mottle virus. *J. Gen. Virol.* 90, 2808-2814.

Ruffel, S., Caranta, C., Palloix, A., Lefebvre, V., Caboche, M. and Bendahmane, A. (2004) Structural analysis of the eukaryotic initiation factor 4E gene controlling potyvirus resistance in pepper: Exploitation of a BAC library. *Gene* 338, 209-216.

Ruffel, S., Dussault, M.H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C. and Caranta, C. (2002) A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J.* 32, 1067-1075.

Ruffel, S., Gallois, J.L., Moury, B., Robaglia, C., Palloix, A. and Caranta, C. (2006) Simultaneous mutations in translation initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E are required to prevent pepper veinal mottle virus infection of pepper. *J. Gen. Virol.* 87, 2089-2098.

Ruffel, S., Gallois, J.L., Lesage, M.L. and Caranta, C. (2005) The recessive potyvirus resistance gene *pot-1* is the tomato orthologue of the pepper *pvr2-eIF4E* gene. *Mol. Genet. Genomics* 274, 346-353.

Rusholme, R.L., Higgins, E.E., Walsh, J.A. and Lydiate, D.J. (2007) Genetic control of broad-spectrum resistance to turnip mosaic virus in *Brassica rapa* (Chinese cabbage). *J. Gen. Virol.* 88, 3177-3186.

Ruud, K.A., Kuhlman, C., Goss, D.J. and Browning, K.S. (1998) Identification and characterization of a novel cap-binding protein from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 273, 10325-10330.

Sachs, A. (2000) Physical and functional interactions between the mRNA cap structure and the poly(A) tail. In *Translational control of gene expression*. (Sonenberg, N., Hershey, J.W.B. and Mathew, M., eds). Cold Spring Harbor Laboratory

Press.

- Sanfaçon, H.** (2015) Plant translation factors and virus resistance. *Viruses* 7, 3392-3419.
- Sato, M., Nakahara, K., Yoshii, M., Ishikawa, M. and Uyeda, I.** (2005) Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor 4E family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by potyviruses. *FEBS Lett.* 579, 1167-1171.
- Schepetilnikov, M., Kobayashi, K., Geldreich, A., Caranta, C., Robaglia, C., Keller, M. and Ryabova, L.A.** (2011) Viral factor TAV recruits TOR/S6K1 signalling to activate reinitiation after long ORF translation. *EMBO J.* 30, 1343-1356.
- Shimada, T.L., Shimada, T. and Hara-Nishimura, I.** (2010) A rapid and non-destructive screenable marker, FAST, for identifying transformed seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 61, 519-528.
- Simon, A.E. and Miller, W.A.** (2014) 3' cap-independent translation enhancers of plant viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 67, 21-42.
- Sonenberg, N., Shatkin, A.J., Ricciardi, R.P., Rubin, M. and Goodman, R.M.** (1978) Analysis of terminal structures of RNA from potato virus X. *Nucleic Acids Res.* 5, 2501-2512.
- Stein, N., Perovic, D., Kumlehn, J., Pellio, B., Stracke, S., Streng, S., Ordon, F. and Graner, A.** (2005) The eukaryotic translation initiation factor 4E confers multiallelic recessive *Bymovirus* resistance in *Hordeum vulgare* (L.). *Plant J.* 42, 912-922.
- Sugawara, K., Shiraishi, T., Yoshida, T., Fujita, N., Netsu, O., Yamaji, Y. and Namba, S.** (2013) A replicase of *Potato virus X* acts as the resistance-breaking determinant for JAX1-mediated resistance. *Mol.*

Plant-Microbe Interact. 26, 1106-1112.

Tamai, A. and Meshi, T. (2001) Cell-to-cell movement of *Potato virus X*: the role of p12 and p8 encoded by the second and third open reading frames of the triple gene block. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 1158-1167.

Tilsner, J., Linnik, O., Louveaux, M., Roberts, I.M., Chapman, S.N. and Oparka, K.J. (2013) Replication and trafficking of a plant virus are coupled at the entrances of plasmodesmata. *J. Cell Biol.* 201, 981-995.

Tilsner, J., Linnik, O., Wright, K.M., Bell, K., Roberts, A.G., Lacomme, C., Cruz, S.S. and Oparka, K.J. (2012) The TGB1 movement protein of *Potato virus X* reorganizes actin and endomembranes into the X-body, a viral replication factory. *Plant Physiol.* 158, 1359-1370.

Truniger, V. and Aranda, M.A. (2009) Recessive resistance to plant viruses. *Adv. Virus Res.* 75, 119-159.

Truniger, V., Nieto, C., González-Ibeas, D. and Aranda, M. (2008) Mechanism of plant eIF4E-mediated resistance against a Carmovirus (*Tombusviridae*): cap-independent translation of a viral RNA controlled *in cis* by an (a)virulence determinant. *Plant J.* 56, 716-727.

Vaira, A.M., Maroon-Lango, C.J. and Hammond, J. (2008) Molecular characterization of Lolium latent virus, proposed type member of a new genus in the family *Flexiviridae*. *Arch. Virol.* 153, 1263-1270.

Verchot, J., Angell, S.M. and Baulcombe, D.C. (1998) In vivo translation of the triple gene block of potato virus X requires two subgenomic mRNAs. *J. Virol.* 72, 8316-8320.

Verchot-Lubicz, J., Torrance, L., Solovyev, A.G., Morozov, S.Y., Jackson, A.O. and Gilmer, D. (2010) Varied movement strategies employed by triple gene

block-encoding viruses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23, 1231-1247.

Verchot-Lubicz, J., Ye, C.M. and Bamunusinghe, D. (2007) Molecular biology of potexviruses: recent advances. *J. Gen. Virol.* 88, 1643-1655.

Walsh, J.A., Rusholme, R.L., Hughes, S.L., Jenner, C.E., Bambridge, J.M., Lydiate, D.J. and Green, S.K. (2002) Different classes of resistance to turnip mosaic virus in *Brassica rapa*. *Eur. J. Plant Pathol.* 108, 15-20.

Wan, J., Cabanillas, D.G., Zheng, H. and Laliberté, J.F. (2015) Turnip mosaic virus moves systemically through both phloem and xylem as membrane-associated complexes. *Plant Physiol.* 167, 1374-1388.

Wang, A. and Krishnaswamy, S. (2012) Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. *Mol. Plant Pathol.* 13, 795-803.

Wang, X., Kohalmi, S.E., Svircev, A., Wang, A., Sanfacon, H. and Tian, L. (2013) Silencing of the host factor *eIF(iso)4E* gene confers Plum pox virus resistance in plum. *PLoS ONE* 8, e50627.

Waterworth, H.E. and Hadidi, A. (1998) Economic losses due to plant viruses. In *Plant Virus Disease Control*. (Hadidi A., Khetarpal R.K. and Koganezawa H. eds) American Phytopathological Society Press.

Xiong, R. and Wang, A. (2013) SCE1, the SUMO-conjugating enzyme in plants that interacts with N1b, the RNA-dependent RNA polymerase of Turnip mosaic virus, is required for viral infection. *J. Virol.* 87, 4704-4715.

Yamaji, Y., Maejima, K., Ozeki, J., Komatsu, K., Shiraishi, T., Okano, Y., Himeno, M., Sugawara, K., Neriya, Y., Minato, N., Miura, C., Hashimoto, M. and Namba, S. (2012) Lectin-mediated resistance impairs plant virus infection at the cellular level. *Plant Cell* 24, 778-793.

- Yoshii, M., Nishikiori, M., Tomita, K., Yoshioka, N., Kozuka, R., Naito, S. and Ishikawa, M.** (2004) The *Arabidopsis Cucumovirus Multiplication 1* and 2 loci encode translation initiation factors 4E and 4G. *J. Virol.* 78, 6102-6111.
- Yoshii, M., Yoshioka, N., Ishikawa, M. and Naito, S.** (1998) Isolation of an *Arabidopsis thaliana* mutant in which accumulation of cucumber mosaic virus coat protein is delayed. *Plant J.* 13, 211-219.
- Zhang, X., Zhao, X., Zhang, Y., Niu, S., Qu, F., Zhang, Y., Han, C., Yu, J. and Li, D.** (2013) N-terminal basic amino acid residues of *Beet black scorch virus* capsid protein play a critical role in virion assembly and systemic movement. *Virol. J.* 10, 200.
- Zimmern, D.** (1975) The 5' end group of tobacco mosaic virus RNA is m⁷G^{5'}ppp^{5'}Gp. *Nucleic Acids Res.* 2, 1189-1202.
- 明日山秀文, 平井篤造.** (1949) ジャガイモ連葉性モザイク病に就いて. 日植病報. 13, 29-32.
- 池上正人, 上田一郎, 奥野哲郎, 夏秋啓子, 難波成任.** (2009) 植物ウイルス学 朝倉書店
- 竹内徹, 佐々木純.** (2003) ユリエそ病の病原となる Potexvirus は Plangato asiatica mosaic virus (PlAMV) の 1 系統である. 日植病報. 69, 329-330.
- 長井雄治, 石毛裕子, 古川淳, 山下修一.** (1995) 各種ラン科植物におけるウイルスの感染状況とその病徴. 関東東山病害虫研究会年報 1995, 153-155.
- 難波成任.** (2008) 植物医科学 (上) 養賢堂
- 福田至朗, 加藤晋朗, 吉田桂子, 水上優子, 石田朗, 上田淳一, 神戸三智雄,**

石本佳之. (2003) Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP)法によるシンビジウムモザイクウイルス(CyMV)の検出. 日植病報. 69, 411-414.

堀尾英弘, 矢野勇夫, 江住和雄. (1969) わが国で見出されたジャガイモ M ウイルス. 日植病報. 35, 47-54.

宮下脩平, 高橋英樹. (2015) 植物の R 遺伝子によるウイルス抵抗性. ウイルス 65, 199-208.

興良清. (1962) ジャガイモ品種の X ウイルス抵抗性に関する研究. 日植病報. 27, 214-218.