

## 論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成 26 年度博士課程進学

氏名 桂馬拓也

指導教員名 難波成任

論文題目 フレキシウイ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

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では *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、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 アイソフォームに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。