

# 博士論文

論文題目

植物ウイルスの増殖制御機構と  
その病原性に関する研究

氏名

岡野 夕香里





# 目次

<b>第 1 章 緒論</b> .....	<b>1</b>
1. 植物ウイルス .....	1
2. 植物ウイルスの増殖制御機構 .....	1
2.1 植物ウイルスの増殖過程 .....	1
2.2 植物が備えているウイルス増殖抑制機構 .....	2
3. 植物におけるウイルスの病原性 .....	4
<b>第 2 章 ウイルスの病原性に関わる複製酵素に関する解析</b> .....	<b>6</b>
1. 序文 .....	6
1.1 ポインセチアモザイクウイルス .....	6
1.2 <i>Tymovirus</i> 科 .....	8
1.3 植物ウイルスの病原性に関与するウイルス因子 .....	10
2. 材料および方法 .....	11
2.1 供試植物およびウイルス .....	11
2.2 ウイルス粒子精製 .....	12
2.3 ウイルス粒子の電子顕微鏡観察 .....	12
2.4 RNA 抽出 .....	12
2.5 RT-PCR .....	13
2.6 ダイレクトシーケンス .....	13
2.7 シーケンス解析、系統解析および相同性解析 .....	13
3. 結果 .....	17
3.1 ウイルス粒子精製と RT-PCR .....	17
3.2 全ゲノム配列決定とゲノム構造解析 .....	17
3.2.1 全ゲノム配列の決定 .....	17
3.2.2 ウイルスゲノム構造解析 .....	19
3.3 遺伝子発現様式 .....	28
3.3.1 Cleavage site の解析 .....	28
3.3.2 tymobox についての解析 .....	30
3.4 PnMV の遺伝的多様性の解析 .....	32
3.4.1 RdRp 配列の比較解析 .....	32
3.4.2 CP 配列の比較解析 .....	44
3.5 系統解析 .....	44
3.5.1 <i>Tymovirus</i> 科ウイルス間の系統解析 .....	44
3.5.2 PnMV 分離株間の系統解析 .....	46

3.6	配列の比較解析に基づく病徴決定因子の推定.....	46
4.	考察.....	47
4.1	PnMV の病原性に関与する因子.....	48
4.2	PnMV 分離株間に見出されたアミノ酸配列の多様性について.....	48
4.3	PnMV の遺伝子発現様式.....	50
<b>第 3 章</b>	<b>植物によるウイルス増殖抑制機構を抑止するウイルス因子の解析.....</b>	<b>52</b>
1.	序文.....	52
1.1	ウイルス防御機構としての RNA サイレンシングと tasiRNA 経路.....	52
1.2	植物ウイルスにコードされる RNA サイレンシングサプレッサー.....	56
1.3	<i>Potexvirus</i> 属ウイルスにコードされるサプレッサー.....	57
2.	材料および方法.....	59
2.1	供試植物.....	59
2.2	供試ウイルスおよび接種法.....	59
2.3	ベクター構築.....	60
2.4	ノーザンブロット解析.....	63
2.5	RNase protection assay.....	64
2.6	小分子 RNA ライブラリーの作製と大規模シーケンス.....	65
2.7	シーケンスデータ解析.....	65
2.7.1	タグ分類とフィルタリング.....	65
2.7.2	ゲノムへのマッピング.....	67
2.7.3	アノテーション.....	68
2.7.4	発現量の計算.....	69
2.7.5	既知 sRNA にヒットした配列の長さごとの頻度分布.....	70
3.	結果.....	72
3.1	大規模シーケンスによる sRNA 発現量の網羅的解析.....	72
3.2	TAS 前駆体 RNA の切断解析.....	84
3.3	二本鎖 RNA の蓄積量の解析.....	85
3.4	TGBp1 形質転換体における 2b 遺伝子欠損 CMV の蓄積量に関する解析.....	87
4.	考察.....	89
4.1	PIAMV の TGBp1 による RNA サイレンシング抑制機構.....	89
4.2	TGBp1 のヘリカーゼ活性が RNA サイレンシングの抑制において果たす役割.....	90
4.3	<i>Potexvirus</i> 属ウイルスの TGBp1 による RNA サイレンシング抑制メカニズム.....	91
4.4	二本鎖 RNA 合成阻害の普遍性について.....	91
<b>第 4 章</b>	<b>病原性決定因子を利用した効率的なタンパク質発現系の構築.....</b>	<b>94</b>
1.	序文.....	94

2. 材料および方法 .....	95
2.1 供試ウイルスおよび接種法 .....	95
2.2 ベクター構築 .....	98
2.3 蛍光観察 .....	106
2.4 ウェスタンブロット解析 .....	106
2.5 RNA 抽出および RT-PCR.....	107
2.6 ノーザンブロット解析.....	107
3. 結果 .....	109
3.1 PIAMV を利用したウイルスベクターの構築.....	109
3.2 外来遺伝子の翻訳開始点の最適化.....	109
3.3 2A 配列による GFP と外被タンパク質の融合 .....	111
3.4 PIAMV ベクターおよび PVX ベクターによる GFP 発現パターンの比較 .....	113
3.5 PIAMV ベクターおよび PVX ベクターの RNA サイレンシング誘導能の比較 .....	115
3.6 シロイヌナズナへの接種試験.....	117
3.7 植物体における 2 種のタンパク質の同時発現 .....	117
4. 考察 .....	120
4.1 PIAMV ベクター構築の過程で得られた示唆.....	120
4.2 PIAMV ベクターの特徴 .....	121
<b>第 5 章 総合考察.....</b>	<b>123</b>
<b>摘要 .....</b>	<b>127</b>
<b>謝辞 .....</b>	<b>130</b>
<b>引用文献 .....</b>	<b>131</b>

## 第1章 緒論

### 1. 植物ウイルス

植物ウイルスは核酸とタンパク質から構成される微小粒子である。独自の代謝系を持たず自身のゲノム核酸にコードされるタンパク質と宿主植物のタンパク質を利用し、酵素反応・分子間力・化学平衡などの宿主細胞内での生理反応を原動力としてあたかも生物であるかのようにゲノム核酸を増殖させる。植物ウイルスはゲノム核酸の種類によって、一本鎖DNAウイルス、二本鎖DNAウイルス、一本鎖RNAウイルス、二本鎖RNAウイルスに分類される。植物ウイルスはプラス一本鎖RNA (mRNAと同じ極性のRNAをプラス鎖RNA、その相補鎖RNAをマイナス鎖RNAと呼ぶ) をゲノムに持つものが最も一般的で、植物ウイルス全体のおよそ70%を占める。

植物ウイルスの感染により、作物の品質および生産量は著しく低下する。その被害は全作物生産量の約10%に達すると言われているが、局所的にはさらに深刻な被害を与えている場合もあると考えられる。植物ウイルスは宿主の細胞内に寄生して増殖することから、農薬などによる化学的防除は不可能である。そのため、植物ウイルスの防除には主に抵抗性品種の開発や媒介昆虫の駆除、弱毒ウイルスの利用などに頼らざるを得ない状況である。しかしゲノム核酸に変異を獲得しやすいという植物ウイルス特有の性質を考慮すると、いずれの手法もその効果は限られている。従って、多様な植物ウイルスに共通した感染戦略を明らかにすることにより、普遍性のあるウイルス防除手法の確立が望まれている。

### 2. 植物ウイルスの増殖制御機構

#### 2.1 植物ウイルスの増殖過程

植物ウイルスのゲノムには多くの場合、少なくとも3つのウイルスタンパク質がコードされている。すなわち、ゲノムの複製を担う複製酵素 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)、細胞間移行に関与する移行タンパク質 (movement protein, MP)、そしてゲノムRNAを被いウイルス粒子を構成する外被タンパク質 (coat protein, CP) である。ウイルスが宿主植物細胞に侵入すると、CPがゲノムRNAから解離し、露出したゲノムRNAをmRNAとしてRdRpなどのウイルスタンパク質が翻訳され、それに引き続いてゲノムの複製が起こる。複製は、RdRpがゲノムであるプラス鎖RNAを鋳型としてマイナス鎖RNAを合成し、このマイナス鎖RNAがプラス鎖RNA合成の鋳型となるという順序で行われる。この過程で、大量の子孫ウイルスRNAが合成されるとともに、タンパク質翻訳のための短いRNA (サブゲノムRNA) が合成され、それを介してCPが翻訳されて、子孫のウイルス粒子が形成される。複製された子孫ウイルスは、MPの働きによりプラズモデスマータ (原形質連絡) と呼ばれ

る植物細胞間を繋ぐ構造を通過し、隣接細胞へと移行する。この過程は細胞間移行と呼ばれ、ウイルスは細胞間移行と複製を繰り返すことで周囲の細胞へと拡がる。さらにウイルスは篩管流に乗って長距離移行を行い、上葉へと移行する（図1.1）。移行先の細胞で再び複製を行うことによって、植物体全体におけるウイルスの増殖が進行する。植物ウイルスの宿主城、粒子の形態、ゲノム核酸の種類、ゲノム構造などは多様であるが、複製と細胞間移行、および長距離移行という3つの過程を経て植物の全身に感染する点は多くのウイルスに共通であると考えられている（Hull, 2002）。

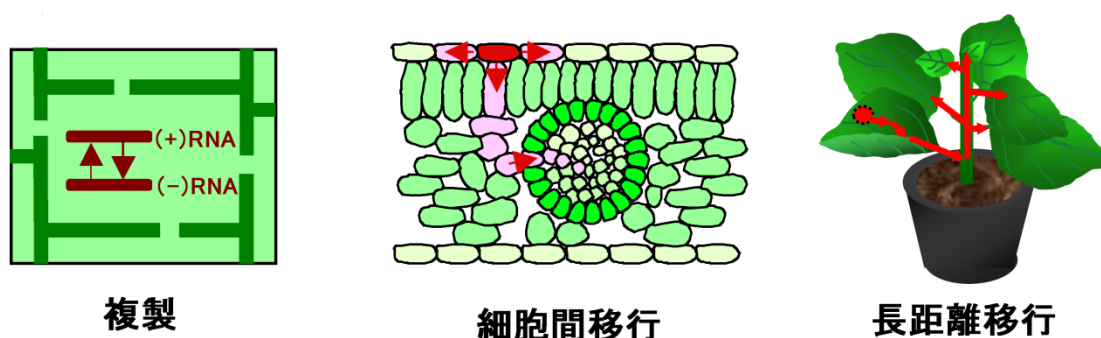


図 1.1 植物ウイルスの感染過程

左から、複製、細胞間移行、長距離移行のモデル図を示す。赤い矢印は植物ウイルスの移行経路を示す。

## 2.2 植物が備えているウイルス増殖抑制機構

植物ウイルスが、上記した複製・細胞間移行・長距離移行の過程を経て、植物体全体に蔓延する場合、その植物は「感受性 (susceptibility)」と呼ばれる。それに対し、感染が成立せず発病しない植物は「抵抗性 (resistance)」と呼ばれる。抵抗性の植物は、ウイルスの増殖を抑制する何らかの機構を持っていると考えられる。これまでに、そのような機構がいくつか明らかにされてきており、主な機構を以下に示す。

### ① 過敏感反応を伴った増殖抑制機構

植物ウイルスを植物に接種すると、接種部位に小さな壊死斑点が現れることがある。この病斑は局部病斑あるいは局部壊死斑と呼ばれる。ウイルスは病斑とその周辺に閉じ込められるため、ウイルスの増殖が抑制される。この病斑は植物細胞がウイルスの持つ特定の因子（エリシター）を認識することによって、自発的に細胞死を伴った反応を起こすことにより形成される。このような反応は過敏感反応 (hypersensitive reaction, HR) と呼ばれ、植

物品種の持つ抵抗性遺伝子 (*R* 遺伝子) と特定のウイルス系統の持つ非病原性遺伝子 (*Avr* 遺伝子) の組み合わせにより誘導されると考えられており、この説は「遺伝子対遺伝子説 (gene-for-gene theory)」と呼ばれている (Fraser, 1987)。このような、*R* タンパク質とエリシターの相互作用により誘導される *HR* に関しては多くの研究がなされており、例えば、*TMV* に対して *N* 遺伝子をもつタバコが示す *HR* はその一つである。この場合、タバコの *N* 遺伝子産物 (*N* タンパク質) が *R* タンパク質として、*TMV* の *RdRp* 内部のヘリカーゼドメイン (*p50*) がエリシターとして同定されており、両者の相互作用により *HR* が誘導される。この *HR* により *TMV* は初期感染細胞に封じ込められ、全身感染できない。他にも、遺伝学的な解析やアグロインフィルトレーション法による一過的発現系 (3章 2.5項参照) による解析により、*HR* を誘導する *R* タンパク質とエリシターの組み合わせが、さまざまな植物と病原体との相互作用において同定されている (Bendahmane et al., 1995; Teraporewala and Culver, 1997; Mestre et al., 2000)

#### ② *Tm-1* 遺伝子によるウイルス複製の抑制

tomato mosaic virus (*ToMV*) などの *Tobamovirus* 属に分類されるウイルスは、*Tm-1* 遺伝子という抵抗性遺伝子を持つトマト品種に感染できない。*ToMV* の増殖は *Tm-1* 遺伝子を持つトマトのプロトプラストで抑制されることから、*Tm-1* は一細胞レベルで *ToMV* の増殖を抑制する (Ishibashi et al., 2007)。さらに、*Tm-1* は *ToMV* の *RdRp* と結合しその機能を阻害することで、ウイルスゲノムの複製を抑制することが、*in vitro* で明らかとなっている。

#### ③ レクチン抵抗性

近年、*Potexvirus* 属に分類されるウイルスである *plantago asiatica mosaic virus* (*PIAMV*) を用いたモデル植物 *Arabidopsis thaliana* のスクリーニングにより、レクチンタンパク質をコードする抵抗性遺伝子 *JAX1* が同定された (Yamaji et al., 2012)。*PIAMV* の増殖は *JAX1* を発現させた植物のプロトプラストで抑制されることから、*JAX1* は一細胞レベルで *PIAMV* の増殖を抑制していることが明らかとなっている。レクチンはヒトや動物の免疫活性化や癌細胞増殖抑制の働きがあるが、植物においても病原体に対する防御応答に関わっていることが明らかとなった。

#### ④ RNA サイレンシングによる増殖抑制機構

RNA サイレンシングは当初、紫色のペチュニアの花色を強めようとアントシアニン合成遺伝子を導入したところ、予想に反して花卉が白色の斑入りとなる現象が発端となり発見された (Napoli et al., 1990)。その後、遺伝子の過剰導入によって、その遺伝子の発現が抑制される現象 (ジーンサイレンシング) は、線虫やショウジョウバエでも報告され、線虫に長鎖二本鎖 RNA を導入した場合に、同じ塩基配列をもつ遺伝子の発現が抑制されること (Fire et al., 1998)、並びに、ジーンサイレンシングを誘導したトマトでは、導入した遺伝子の配列

に特異的な二十数塩基長の小分子 RNA (small RNA, sRNA) が検出されることが明らかとなった (Hamilton and Baulcombe, 1999)。この sRNA を介した配列特異的な遺伝子発現抑制機構は“RNA サイレンシング”と呼ばれるようになり、今日では真核生物に広く保存された機構であることが知られている。

RNA サイレンシング機構ではまず、二本鎖 RNA から Dicer と呼ばれる RNase III 様酵素によって 21-24 塩基長の sRNA が切り出される。生じた sRNA は Argonaute (AGO) タンパク質を含む複合体 (RNA-induced silencing complex; RISC) に取り込まれ、sRNA と相補的な配列をもつ RNA の切断分解、翻訳抑制、あるいは DNA のメチル化やクロマチンの構造変換が誘導される。植物においては、RNA サイレンシングは、ウイルスや導入遺伝子など外来性の核酸種に対する防御機構の役割も果たしており、植物自身の遺伝子を制御する RNA サイレンシング機構と類似した経路により、ウイルスの RNA を切断し、ウイルスの複製や移行を阻害することでウイルスの増殖を抑制する (Ding and Voinnet, 2007)。

植物ウイルスの多くは宿主植物の RNA サイレンシングに対抗するため、RNA サイレンシング抑制タンパク質 (サプレッサー) を持つ。多くの植物ウイルスでサプレッサーに変異を導入した場合に、ウイルス蓄積量の減少や病徴の軽減、感染性の喪失が起きることが報告されていることから、宿主植物の RNA サイレンシングを抑制することはウイルスが感染を成立させるにあたって重要なプロセスであると考えられる (Csorba et al., 2009; Li and Ding, 2006; Silhavy and Burgyán, 2004)。サプレッサーの作用機構については、すでにいくつかのウイルスで詳細に明らかにされている。これまでに作用機構が明らかにされたサプレッサーは、それぞれ RNA サイレンシングの様々な段階を抑制するが、多くのサプレッサーに共通した作用点は sRNA との結合および AGO1 との結合による RISC 形成阻害や RISC 機能阻害である。

### 3. 植物におけるウイルスの病原性

植物ウイルスの多くは、宿主植物に感染すると、様々な症状 (病徴) を伴った病気を引き起こす。植物ウイルスの引き起こす病徴は、ウイルスの種類によって葉、茎、根、花、果実、種子など植物体の様々な器官に現れる。葉の病徴に例を取っても、モザイク、斑紋、退緑斑点、黄化、壊死、輪紋、葉脈透過、葉脈緑退、縮葉、漣葉など多種多様である。しかし、感染植物全身にウイルスが分布しているにも関わらず病徴が現れないこともあり、これは無病徴感染と呼ばれる。ウイルスによって引き起こされる典型的な病徴は、ウイルスと宿主植物との組み合わせにより決まるが、同じウイルス種でも系統により、また同じ宿主植物種でも品種により病徴の異なる例がしばしば認められる。

また、病徴は温度、光、土壌、栄養など植物の生育に関与する環境要因によっても左右される。タバコモザイクウイルス (tobacco mosaic virus, TMV) の感染によりタバコ属植物 *Nicotiana glutinosa* の葉に生じる局部えそ斑点症状の径は、高温になるほど大きくなる。セ

ンニチコウ (*Gomphrena globosa*) における PVX による病徴は暗黒下では現れないが、明条件下では現れる。こうした例は、植物ウイルスが宿主に感染・増殖する過程で、宿主側の因子の影響を強く受けることを示している。植物ウイルスは自身の増殖に要する因子の大半を宿主に依存するため、環境要因その他の変化による植物の生理状態の変化は、ウイルスの感染や増殖、ひいては病原性発現にも大きな影響を与える。

これまで一般に、ウイルスの感染により宿主植物に引き起こされる多様な病徴は、組織内に蓄積するウイルス核酸や種々のウイルスタンパク質により宿主細胞の正常な代謝活動が攪乱される結果もたらされるものと推測されてきた (Culver and Padmanabhan, 2007; Fraser, 1987; Hull, 2002)。一方で、植物は様々なウイルス増殖抑制機構を通じてウイルスの増殖を抑制しようとする。反対に、ウイルス側は、それら宿主の増殖抑制機構を回避する機構を備えており、ウイルス感染に伴い発現する病徴はまさに両者のせめぎ合いの結果生じるものであると考えられる。さらに、植物におけるこれら一連の現象の誘導には、単一細胞レベルでの応答だけでなく、葉肉細胞、維管束細胞といった組織特異的な応答もある。また、ウイルスの全身感染には植物の物質転流における「シンク-ソース」の関係も深く関わっていると考えられ (Oparka, et al., 1999; Ruiz-Medrano, et al., 2004)、感染植物の葉位や葉齢も考慮する必要がある。このように、ウイルスの植物への感染とそれに伴う植物の応答は複雑であるため、その結果として生ずる病徴形成のメカニズムの解析は容易ではない。そのため、病徴形成の詳細なメカニズムの解析は極めて少ない。

以上のように、植物ウイルスの病原性が発現する詳細な過程はほとんど明らかになっておらず、その中で、ウイルス増殖制御機構が果たす役割についてもほとんど解析されていない。これを解明することは、ウイルス-植物の複雑な相互作用を理解するだけでなく、有効なウイルスの防除法の開発にも繋がるものである。本研究では、ウイルスの病原性に **RdRp** が関わることを明らかにし、ウイルスの増殖が病原性を決定する要因であることを示した。また、植物によるウイルスの増殖抑制機構 (RNA サイレンシング) に対抗するウイルス因子 (サプレッサー) が RNA サイレンシングを抑止することにより、ウイルスの増殖を促進し、病原性を強化していることを明らかにした。さらに、サプレッサーの RNA サイレンシング抑制活性を利用して、植物における高効率なタンパク質発現系を構築した。



## 第2章 ウイルスの病原性に関わる複製酵素に関する解析

### 1. 序文

#### 1.1 ポインセチアモザイクウイルス

ポインセチアモザイクウイルス (poinsettia mosaic virus, PnMV) は、ポインセチア (トウダイグサ科トウダイグサ属, *Euphorbia pulcherrima*) に感染し、「ポインセチアモザイク病」(図 2.1) を引き起こす病原ウイルスであることが証明されている (Chiko et al., 1983)。PnMV が感染したポインセチアでは葉にモザイク症状のほか、退緑斑や輪紋、奇形などの病徴が生ずる (Pfannenstiel et al., 1982)。ポインセチアの繁殖は大部分が人為的な栄養繁殖により行われているため、人の手により、気づかぬうちに PnMV の感染が広範囲に蔓延する危険性がある。実際に、本病は世界中の商業用のポインセチアに発生が認められ (Koenig et al., 1986)、しばしば、poinsettia alphacryptovirus (PnCV) や、植物篩部細胞寄生性の植物病原細菌であるファイトプラズマと共感染している (Koenig and Lesemann, 1980; Lee et al., 1997)。中でも、ファイトプラズマはポインセチアに感染することにより、商業用ポインセチアの顕著な特徴である過剰な分枝形成や草丈の萎縮を誘導することが知られている (Preil et al., 1982)。モザイクなどのウイルスの病徴が認められず、かつ分枝の多い植物体の方が商品価値が高いという理由から、PnMV が感染しておらず、ファイトプラズマのみが感染したポインセチアを選択し増殖することが理想的である。このため、PnMV の感染・発病の分子機構を解明し、本ウイルスの防除に対する新規なアプローチを見いだすことが期待されている。

PnMV は Fulton によりそのウイルス粒子が初めて純化された (Fulton and Fulton, 1980)。ウイルス粒子は直径 25-26 nm の球状の構造をとり (図 2.2)、粒子内に約 6,100 塩基のプラス 1 本鎖 RNA ゲノムを含む (図 2.3)。ゲノムの 5' 末端の構造は未知であり、3' 末端に poly (A) 配列を持つ。2000 年にはドイツ分離株 (PnMV-G) の全塩基配列が初めて報告され、以下のような特徴が明らかとなった (Bradel et al., 2000)。すなわち、PnMV のゲノム内には単一の大きな ORF (Open Reading Frame) が存在する。この ORF は約 220.5 kDa のタンパク質をコードしていると推定され、このタンパク質の一部には、N 末端より RdRp および CP に特徴的なアミノ酸配列が存在する。特に RdRp 上には、ウイルス RNA の 5' キャップ合成に関与すると推定されるメチルトランスフェラーゼドメイン (methyltransferase domain, MTR)、RdRp の自己切断に関与するパpain様プロテアーゼドメイン (papain-like protease domain, PRO)、複製の際に二本鎖 RNA の乖離や RNA の高次構造の解きほぐしを行うヘリカーゼドメイン (helicase domain, HEL)、ウイルス RNA 合成に関与するレプリカーゼドメイン (replicase domain, REP)、という 4 つの保存ドメインが存在する。一方で、ウイルスが植物細胞間を移行するのに要する MP と同性的のあるタンパク質をコードするような ORF はこれまでのところ見出されていない。CP の発現様式については、ゲノム構造からは RdRp



図 2.1 ポインセチアモザイク病 (難波ら、1987)

左の写真は PnMV-JN が感染したポインセチアの全体写真。右の写真は葉の拡大写真。病徴の激しいものではモザイク病徴を呈するとともに奇形が見られる (左の葉)。一方で無病徴の葉も見られる (右の葉)。

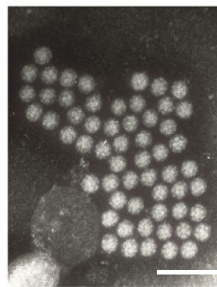


図 2.2 PnMV-JN のウイルス粒子の電子顕微鏡写真 (難波ら、1987)

直径約 28nm の球状である。バーは 100 nm。



図 2.3 ポインセチアモザイクウイルスドイツ分離株 (PnMV-G) のゲノム構造

ゲノムは 6,099 塩基のプラス一本鎖 RNA からなり、5'末端側から RdRp、CP を同一 ORF 上にコードする。5'末端の構造は不明であり、3'末端には poly (A) 配列が存在する。RdRp 上にはメチルトランスフェラーゼドメイン (methyltransferase domain, MTR)、パパイン様プロテアーゼドメイン (papain-like protease domain, PRO)、ヘリカーゼドメイン (helicase domain, HEL)、レプリカーゼドメイン (replicase domain, REP)、という 4 つの保存ドメインが存在する。

と CP が分かれることなく翻訳されると推定される。しかし、ウイルス粒子に対する抗血清を用いたウエスタンブロット解析では、分子量約 21kDa の CP と推定される特異的シグナルが検出される。さらに、PnMV ゲノムの 3'末端配列をプローブに用いたノーザンブロット解析において約 6,100 塩基のゲノム RNA の他に約 650 塩基の RNA が検出される。また、ゲノムの 3'末端から上流に約 650 塩基の位置には AUG コドンが存在する。以上から、ゲノムの途中から転写されるサブゲノム RNA を介して CP が発現する可能性が指摘されている (Bradel et al., 2000)。

## 1.2 *Tymovirus* 科

*Tymovirus* 科は *Tymovirus* 属、*Marafivirus* 属、*Maculavirus* 属の 3 つの属を含む。*Tymovirus* 科に属するウイルスの特徴は以下の通りである。

- ① ウイルス粒子は被膜をもたない半径約 30 nm の球形の粒子で、その粒子表面には突起状の構造を持ち、CP サブユニットが五量体もしくは六量体に集積している。
- ② 2 回の遠心分離によって得られた純化ウイルスの集積物内は主にウイルスゲノムを含む感染性を持つ核タンパク質および、CP 発現の為のサブゲノム RNA のような小さい RNA といった非感染性の物質が含まれている。
- ③ ゲノムがプラス 1 本鎖 RNA で、シチジンの含まれる量が比較的多く (30~50%)、5'末端はキャップ構造を持つ。非常に大きな ORF を持ち、その ORF には複製に関連するタンパク質をコードする。
- ④ ORF1 にコードされるポリタンパク質は、ウイルスの持つパピイン様プロテアーゼによって分解を受けると考えられており、一方で CP はサブゲノム RNA を介して発現する。
- ⑤ 感染細胞内で変形した構造体が観察される。これはウイルスの複製の段階で、葉緑体および、ミトコンドリアが激しく変形することから始まり、それらの周辺では境界膜の局所的な陥入より生じた小胞が並ぶことが確認されている。

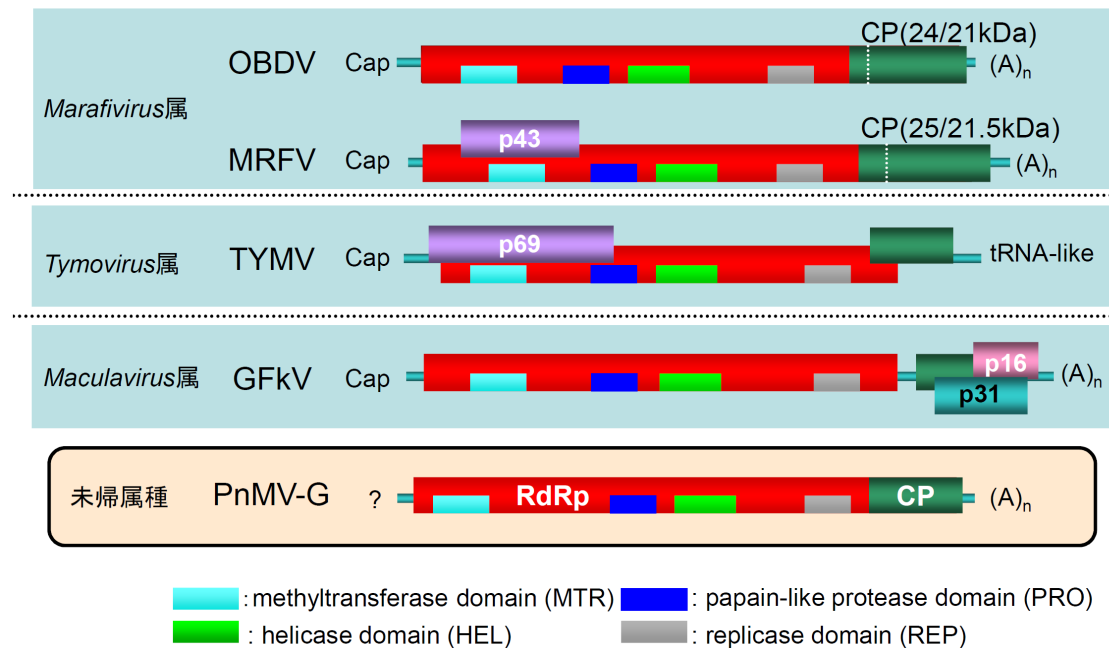


図 2.4 Tymovirus 科のウイルスのゲノム構造

ウイルスの正式名称は以下の通り。OBDV: *Oat blue dwarf virus*、MRFV: *Mayze rayado fino virus*、TYMV: *Turnip yellow mosaic virus*、GFKV: *Grapevine fleck virus*、PnMV-G: *Poinsettia mosaic virus* のドイツ分離株。

国際ウイルス分類委員会 (ICTV) の報告によると (2013 年 12 月現在)、*Tymovirus* 科には、*Tymovirus* 属 26 種、*Marafivirus* 属 7 種、*Maculavirus* 属 1 種、そして、未帰属種である PnMV および *Bombyx mori latent virus* を含めた合計 36 種のウイルスが含まれる (暫定種を除く)。これら 3 属の違いは、いくつかの基準によって分類されている。それぞれの基準について、PnMV の性状とともに説明すると、以下のようになる。

- ① 植物体内における所在と宿主範囲: *Tymovirus* 属は師管に加え柔細胞などにも分布し、双子葉植物に感染する。一方で、*Marafivirus* 属と *Maculavirus* 属は分布が師管に限定される。(Lockhart et al., 1985)。*Marafivirus* 属は主に単子葉植物に感染、*Maculavirus* 属は双子葉植物に感染する。PnMV は師管に加え柔細胞などにも分布し、双子葉植物に感染できることから *Tymovirus* 属ウイルスに近い性質をもつと考えられる。
- ② 伝播様式: *Tymovirus* 属は機械接種が可能であるほか、甲虫などの昆虫によって媒介される。*Marafivirus* 属は機械接種ができないが、多くがヨコバイによって媒介される。一方で、*Maculavirus* 属の伝播様式は不明である。また、PnMV は媒介生物が未同定であるが、機械接種が可能であることから、*Tymovirus* 属ウイルスに近い性質をもつと考えられる。
- ③ 細胞内形態: *Tymovirus* 属は葉緑体の二重膜を変形させて小胞の形成を誘導し (Lesemann et al., 1983)、*Marafivirus* 属および *Maculavirus* 属はミトコンドリアの外膜を変形させて小胞の形成を誘導する。PnMV は、葉緑体由来の小胞を誘導する点では *Tymovirus* 属に類似して

いるが、二重膜ではなく単膜の小胞を形成する点が異なる (Lesemann et al., 1983)。

④ ゲノム RNA と CP : ゲノム RNA の大きさは、*Tymovirus* 属は 6.0~6.7 kb、*Marafivirus* 属は 6.3~6.5 kb、*Maculavirus* 属は 7.5 kb である。また、CP の大きさにおいては、*Tymovirus* 属は 20 kDa、*Maculavirus* 属は 21 kDa のもの一種類のみ検出されるが、*Marafivirus* 属は 21 kDa および 24 kDa の二種類の CP が検出される。また、*Tymovirus* 属と *Marafivirus* 属においては、CP の開始コドンの 60 塩基上流に CP を翻訳するためのサブゲノム RNA のプロモーターと考えられる *tymobox* (CAG GGT GAA TTG CTT C) が、35 塩基上流には転写開始点である *initiation box* (CAAG または CCAT または CAAT) が保存されている。*Marafivirus* 属は *marafibox* と呼ばれる *tymobox* と類似した配列および *initiation box* を持つ (Edwards et al., 1997)。一方、*Maculavirus* 属ではそのような配列が確認されていない (Fauquet et al., 2005)。PnMV は約 6.1 kb のゲノムサイズで、CP のサイズは 21 kDa の一種類であることから *Tymovirus* 属に類似していると考えられる。また、既報の PnMV-G 分離株は *marafibox* と全く同じ配列および *initiation box* を持っており、この点では *Marafivirus* 属と類似している (Bradel et al., 2000)。

⑤ ゲノム構造による基準: *Tymovirus* 属は 3 つの ORF を持ち 3'末端は tRNA 様構造を持つ。また、*Maculavirus* 属は 4 つの ORF を持ち 3'末端には poly (A) tail 配列を有している。一方、*Marafivirus* 属は 2 タイプあり、oat blue dwarf virus (OBDV) に代表されるような一つの大きな ORF を持つものと、maize rayado fino virus (MRFV) のように二つの ORF を持つものがあり、共に 3'末端には poly (A) tail 配列を有している。PnMV はゲノム上に大きな ORF を 1 つ持ち、3'末端は poly (A) tail 構造をとっていることから *Marafivirus* 属の一方のタイプと同様な構造を持っている。

以上のように、PnMV は *Tymovirus* 科に分類されるウイルスではあるものの、理化学的・生物学的性状は *Tymovirus* 属ウイルスに、ゲノム構造は *Marafivirus* 属に類似しており、2 属の間中間的な特徴を持つ。したがって、PnMV は現在提唱されている *Tymovirus* 科における属の分類基準に照らした場合、いずれの属に分類されるかを決定することは非常に困難であることから、PnMV は現在 *Tymovirus* 科の未帰属種とされている。

### 1.3 植物ウイルスの病原性に関与するウイルス因子

近年、植物ウイルスの病原性を決定するウイルス側の因子が、様々なウイルスについて徐々に明らかにされてきている。タバコ茎えそウイルス (tobacco rattle virus) においては、MP がえそ病徴の決定に関わっている (Ziegler-Graff, et al., 1991)。キュウリモザイクウイルス (cucumber mosaic virus, CMV) においては、CP の 129 番目のアミノ酸の変異がタバコにおける退緑斑の形成に関与している (Shintaku, et al., 1992; Takahashi and Ehara, 1993; Suzuki, et al., 1995)。加えて、近年、ウイルスの病原性の決定において、RdRp が重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。ジャガイモ X ウイルス (potato virus X, PVX) では、

3つの分離株 (OS、BH、BS) によって誘導されるタバコにおける病徴が異なっており (それぞれ輪状斑、モザイク、無病徴)、それは RdRp の 1 アミノ酸の違いによって決定されている (Kagiwada et al., 2005)。加えて、plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) では、2つの分離株 (Li1、Li6) がタバコ属植物の *Nicotiana benthamiana* に全身感染し、異なる病徴 (Li1: 全身壊死、Li6: 無病徴) を引き起こす (Komatsu et al., 2011)。Li1 の全身壊死を引き起こすウイルス側の因子は RdRp 内部のヘリカーゼドメインであるが、通常感染しても無病徴である Li6 が持つヘリカーゼドメインも、大量に発現させると、*N. benthamiana* の葉に壊死を誘導する。また、ウイルス増殖量および RdRp の蓄積量は Li6 よりも Li1 の方が著しく多い。これらのことから、PIAMV の Li1 分離株では、ウイルスの増殖量が高まり、結果として複製酵素が多量に蓄積することで壊死病徴が誘導されると考えられる。

PnMV が感染したポインセチアでは葉にモザイク症状のほか、退緑斑や輪紋、奇形などの病徴が生ずることが知られている (Pfannenstiel et al., 1982)。これまでに PnMV の全ゲノム配列はドイツ分離株 (PnMV-G) (Bradel et al., 2000)、ノルウェー分離株 (PnMV-Nor) (Spetz et al., 2008) について報告されている。日本においては、1987年に初めてポインセチアモザイク病の発生が報告されており、JN 分離株 (PnMV-JN) が分離されている (難波ら、1987)。しかしながら、これらの病徴の誘導するウイルス側の因子に着目して行われた研究はなく、PnMV の病徴誘導機構は不明である。一般に植物ウイルスは、同一種と判断される場合でも、分離される地域や植物種、植物個体ごとにゲノム内に多数の変異を伴い、これにより異なる病原性を示す。これらのウイルスは同種内の分離株として区別されている。病原性の異なる分離株間の遺伝的な差異を解析することは、ウイルスの病原性およびウイルスの起源や進化に関する知見を得る上で重要である。そこで本研究では、本邦で栽培された病徴の異なるポインセチアより、4種類の PnMV 分離株 (JO1、JO2、JO4、JO5) を分離し、すでに日本で分離されていた JN 分離株とともに、全ゲノム配列を解読した。次いで、JO 分離株間で配列比較解析を行い、病徴の有無に関与すると考えられる複製酵素内のアミノ酸を見出した。さらに、既報の海外分離株を含めた PnMV 全分離株間で配列比較解析を行った結果、PnMV の分離株間で高い遺伝的多様性が見出された。

## 2. 材料および方法

### 2.1 供試植物およびウイルス

2008年に関東地方で栽培された4株 (No. 1, 2, 4, 5) (品種は全てプリメーロジングルベル) を用いた。4株のうち No. 1 は葉にモザイクと奇形の症状を呈し、No. 5 はモザイク症状のみを呈していた。残りの2株は無病徴であった。また、モザイク病徴を示すポインセチアか

ら精製された PnMV-JN 分離株の精製ウイルス粒子を実験に供試した（難波ら、1987）。

## 2.2 ウイルス粒子精製

実験に供試したポインセチアより葉約 4 g をサンプリングし、液体窒素にて凍結・磨砕後、5 倍量の 50 mM リン酸バッファー(50 mM リン酸バッファー pH7.0、1 mM EDTA、0.1% thioglycerol) を加えた。ミラクロスを用いて濾過した後に濾液の半分量のクロロホルムを加え、激しく攪拌した。3,000xg, 4°C で 15 分間遠心した後、上清に終濃度 8% となるように PEG6000 を加え、完全に溶解するまで室温で攪拌した。さらに終濃度が 0.4 M となるように NaCl を加え、室温で 10 分間攪拌し、16,000xg、4°C で 15 分間遠心して PEG 沈殿を行った。沈殿を 400  $\mu$ l の 10 mM リン酸バッファー (10 mM リン酸バッファー pH7.5、1 mM EDTA) に溶解し、3,000xg、4°C で 15 分間遠心した。その上清をさらに 100,000xg、4°C で 90 分間遠心し、沈殿を 80  $\mu$ l の 10 mM リン酸バッファーに溶解しウイルス粒子溶液を得た。精製ウイルス粒子について、適宜希釈し、分光光度計により 260 nm の吸収極大 (A260) を測定し、以下の計算式に当てはめて濃度を推定した。

$$\text{ウイルス濃度 } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{A260} \times 1/9.6 \times \text{希釈倍率}$$

## 2.3 ウイルス粒子の電子顕微鏡観察

精製ウイルス粒子について、ダイレクトネガティブ染色法による電子顕微鏡観察を行った。ウイルス粒子 1  $\mu$ l を 2% phosphotungstic acid (pH 7.0) 10  $\mu$ l と混合し、カーボン蒸着した銅製のグリッド上に付着させ、余分な液を濾紙に触れさせて除き風乾後、電子顕微鏡観察に供試した。ウイルス粒子の観察には、透過型電子顕微鏡 JEM-1010 (JEOL) を用いた。

## 2.4 RNA 抽出

精製ウイルス粒子 30  $\mu$ l に蒸留水を 128  $\mu$ l 加え、続いて sodium dodecyl sulfate (SDS)、Proteinase K、EDTA をそれぞれ終濃度が 2.5%、3.5 mg/ml、10 mM になるように順に溶解させながら加え、37°C で 30 分間静置し、ウイルスの外被タンパク質を分解した。反応産物についてフェノール抽出を 2 回、CIA 抽出を 2 回行った後、グリコーゲン、3 M 酢酸ナトリウム、100%エタノールをそれぞれ液量の 200 分の 1 量、10 分の 1 量、2.5 倍量加えてエタノール沈殿し、70%エタノールによるリンスを行った後、デジケーターを用いて穏やかに乾燥させた。沈殿を 10  $\mu$ l の RNase free 蒸留水に溶解させて RNA を得た。試料のスペクトルを分光光度計により測定し、以下の式に当てはめて濃度を計測した。

$$\text{RNA 濃度 } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{A260} \times 40 \times \text{希釈倍率}$$

## 2.5 RT-PCR

Reverse Transcriptase XL (AMV) (TaKaRa) を使用し、ウイルス RNA をテンプレートとして RT 反応を行った。ウイルス RNA 0.7  $\mu\text{l}$  に、25 mM の  $\text{MgCl}_2$  を 3  $\mu\text{l}$ 、2.5 mM の dNTP Mixture を 6  $\mu\text{l}$ 、10 $\times$ RNA PCR Buffer を 1.5  $\mu\text{l}$ 、40U/ $\mu\text{l}$  の Ribonuclease Inhibitor (TaKaRa) を 0.3  $\mu\text{l}$ 、5U/ $\mu\text{l}$  の AMV Reverse Transcriptase を 0.2  $\mu\text{l}$ 、20  $\mu\text{M}$  に希釈した Oligo dT プライマーを 0.8  $\mu\text{l}$ 、RNase Free 蒸留水を total volume が 15  $\mu\text{l}$  になるように加え、サーマルサイクラーで 42 $^\circ\text{C}$  30 分、99 $^\circ\text{C}$  5 分反応させ、その後氷冷した。

続いて KOD -Plus- (TOYOBO) を用いて RT 産物を鋳型に PCR を行った。RT 産物 4  $\mu\text{l}$  に 10 $\times$ PCR Buffer for KOD -Plus-を 5  $\mu\text{l}$ 、2 mM の dNTP Mixture を 5  $\mu\text{l}$ 、25 mM の  $\text{MgSO}_4$  を 2.4  $\mu\text{l}$ 、5  $\mu\text{M}$  のフォワード用プライマーおよびリバース用プライマーを各 3  $\mu\text{l}$ 、1U/ $\mu\text{l}$  の KOD -Plus-を 1  $\mu\text{l}$ 、蒸留水を total volume が 15  $\mu\text{l}$  になるように加え、94 $^\circ\text{C}$  2 分を 1 サイクル、94 $^\circ\text{C}$  15 秒、55 $^\circ\text{C}$  30 秒、68 $^\circ\text{C}$  1 分/kbp を 35 サイクル、68 $^\circ\text{C}$  7 分を 1 サイクル反応させ、その後 4 $^\circ\text{C}$  で保存した。使用したプライマーは、報告されている PnMV 分離株において保存されている部分に設計し、表 2.1 にまとめて示した。

## 2.6 ダイレクトシーケンス

RT-PCR を行った後、得られた RT-PCR 産物を用いて ExoSAP 処理を行った。RT-PCR 産物 5  $\mu\text{l}$  に対し、ExoSAP-IT (Amersham) を 2  $\mu\text{l}$  加えて混和し、これをサーマルサイクラーにより 37 $^\circ\text{C}$  で 15 分インキュベートすることでプライマーおよび dNTP を分解、失活させた後に、80 $^\circ\text{C}$  15 分インキュベートし、エキソヌクレアーゼとアルカリフォスファターゼを失活させた。この反応液のうち、3.5  $\mu\text{l}$  ずつをシーケンス用のサンプルとして、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0 (Applied Biosystems) を用いて dideoxy 法によりシーケンスを行った。検出には ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を使用し、塩基配列決定のためのシーケンサーの操作は、付属の操作マニュアルに従った。シーケンスに使用したプライマーは表 2.1 にまとめて示した。

## 2.7 シーケンス解析、系統解析および相同性解析

DNA 解析ソフトウェア Seqman II v4.03 (DNASTAR) を用いて、得られた塩基配列をアセンブルし、断片配列のコンティグを作成し、PnMV の全ゲノムの塩基配列を決定した。得られた塩基配列は遺伝子解析ソフトウェア GENETYX v3.2 (GENETYX Corp.) によって解析を行った。アミノ酸配列解析については、DNA 配列をアミノ酸配列に変換し、塩基配列と同



様に解析した。塩基配列およびアミノ酸配列のアライメントは DNA Data Bank of Japan (DDBJ) のサーバにおける CLUSTALW アルゴリズム (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>) により作成した。作成したアライメントをもとに系統樹作成用ソフトウェア MEGA v3.1 (Kumar 1994) を用いて、近隣接合法による系統樹を作成した。シーケンス解析、系統解析および相同性解析に用いた *Tymovirus* 科ウイルスの配列は、NCBI サーバを通して GenBank データベースより入手した (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。解析に用いた塩基配列のアクセッションナンバーは表 2.2 にまとめて示した。塩基配列およびアミノ酸配列の相同性解析は、GENETYX v3.2 を用いて行った。



表2.2 解新に用いたウイルスの一覧

分類	ウイルスの名称	ウイルスの略称	Genbank Accession No.	Reference		
Tymovirus 科	Tymovirus 属	anagryis vein yellowing virus	AY75 1780	Koenig et al. (2005)		
		chayote mosaic virus	AF 195000	Bernal et al. (2000)		
		dulcamara mottle virus	AY78917	Tzanetakis et al. (2009)		
		eggplant mosaic virus	J04374	Osorio-Keesee et al. (1989)		
		erysimum mosaic virus	AF098523	Srifah et al. (1992)		
		kennedya yellow mosaic virus	D00637	Ding et al. (1990)		
		okra mosaic virus	EF554577	Stephan et al. (2008)		
		ononis yellow mosaic virus	J04375	Ding et al. (1989)		
		physalis mottle virus	PhyMV	Ranjith-Kumar et al. (1998)		
		plantago mottle virus	PlMoV	Koenig et al. (2005)		
		scrophularia mottle virus	ScMV	Koenig et al. (2005)		
		turnip yellow mosaic virus	TYMV	Marie-Dominique et al. (1988)		
		oat blue dwarf virus	OBDV	Edwards et al. (1997)		
		Marafivirus 属	mayze rayado fino virus	MRFV	Hammond et al. (2001)	
		Maculavirus 属	citrus sudden death-associated virus	CSDaV	AY884005	Maccheroni et al. (2005)
			grapevine fleck virus	GFKV	AJ309022	Sabanadvic et al. (2001)
			grapevine red globe virus	GRGV (暫定種)	AF521977	Ghanem-Sabanadvic et al. (2003)
未帰属	bombyx mori latent virus	BnMLV	AB186123	Katsuma et al. (2005)		
	poinsettia mosaic virus	PnMV-German	AJ271595	Bradel et al. (2000)		
Betaflexivirus 科	Trichovirus 属	poinsettia mosaic virus	PnMV-Norwegian 1	Spetz et al. (2009)		
		apple chlorotic leaf spot virus	ACLSV	AM412237		
			MS8152	German et al. (1990)		

### 3. 結果

#### 3.1 ウイルス粒子精製と RT-PCR

実験に供試した 4 株 (No.1, 2, 4, 5) のポインセチアの観察を行ったところ、No.1 は葉に奇形やモザイクなどの激しい症状を呈し、No.5 は葉にモザイク症状のみを呈していた。No.2 および No.4 はモザイク等の症状は見られず、無病徴であった (図 2.5 (a))。病徴の見られた No.1 および No.5 について、PnMV の感染が疑われたため、葉よりウイルス粒子精製を行い、電子顕微鏡観察を行った。また、無病徴の株についても同様の操作を行った。その結果、いずれのサンプルからも PnMV と思われる直径約 25 nm の球状ウイルスが観察された (図 2.5 (b))。次に、精製ウイルス粒子から RNA を抽出し、この RNA を鋳型として RT 反応を行った。続いて RT 産物を鋳型に PnMV 配列特異的な 3 組のプライマーセット (PnMV-414F と PnMV-1373R, PnMV-2211F と PnMV-3750R, PnMV-4816F と PnMV-CP-R) を用いて PCR を行った結果、いずれの株からも予想される長さ (それぞれ約 1.0, 1.5, 0.7 kbp) の増幅が確認され (図 2.5 (c))、4 株のポインセチア全てに PnMV が感染していることが示唆された。そこで No.1, 2, 4, 5 から分離された PnMV をそれぞれ JO1, JO2, JO4, JO5 分離株と名付けた。

#### 3.2 全ゲノム配列決定とゲノム構造解析

##### 3.2.1 全ゲノム配列の決定

前項で得られた RT-PCR 産物を ExoSAP 処理した後、RT-PCR に用いたのと同じプライマーを用いてシーケンスを行い PnMV-G と比較した結果、約 1.0, 1.5, 0.7 kbp の断片からそれぞれ 460-1,330 番目、2,730-3,680 番目、4,920-5,480 番目に相当する領域の塩基配列を読むことができた。同様にしてウイルス RNA をもとに表 2.1 に示した PnMV 特異的プライマーのうち、PnMV-1F と PnMV2213R、PnMV-1F と PnMV-2607R、PnMV-414F と PnMV-2607R、PnMV-3472F と PnMV-CP-R および PnMV-3472F と polydT-Cla I の組み合わせのそれぞれを用いて RT-PCR を行い、約 2.0kbp~2.6kbp の DNA 断片を増幅し、ダイレクトシーケンスにより部分塩基配列を解読した。これらのシーケンスの結果を SeqMan v4.03 (DNASTAR) を用いてアセンブルしたところ、本ウイルスの 5'端から 3'端まで全長をカバーすると考えられるコンティグが得られた。同様にして、JN 分離株の精製ウイルスより抽出した RNA を用いて、JN 分離株の全塩基配列を得た。これらの分離株は 3'末端に poly A 配列を持ち、ゲノムサイズは poly A 配列を除いて 4 つの JO 分離株はいずれも 6,106 塩基、JN 分離株は 6,095 塩基であった。

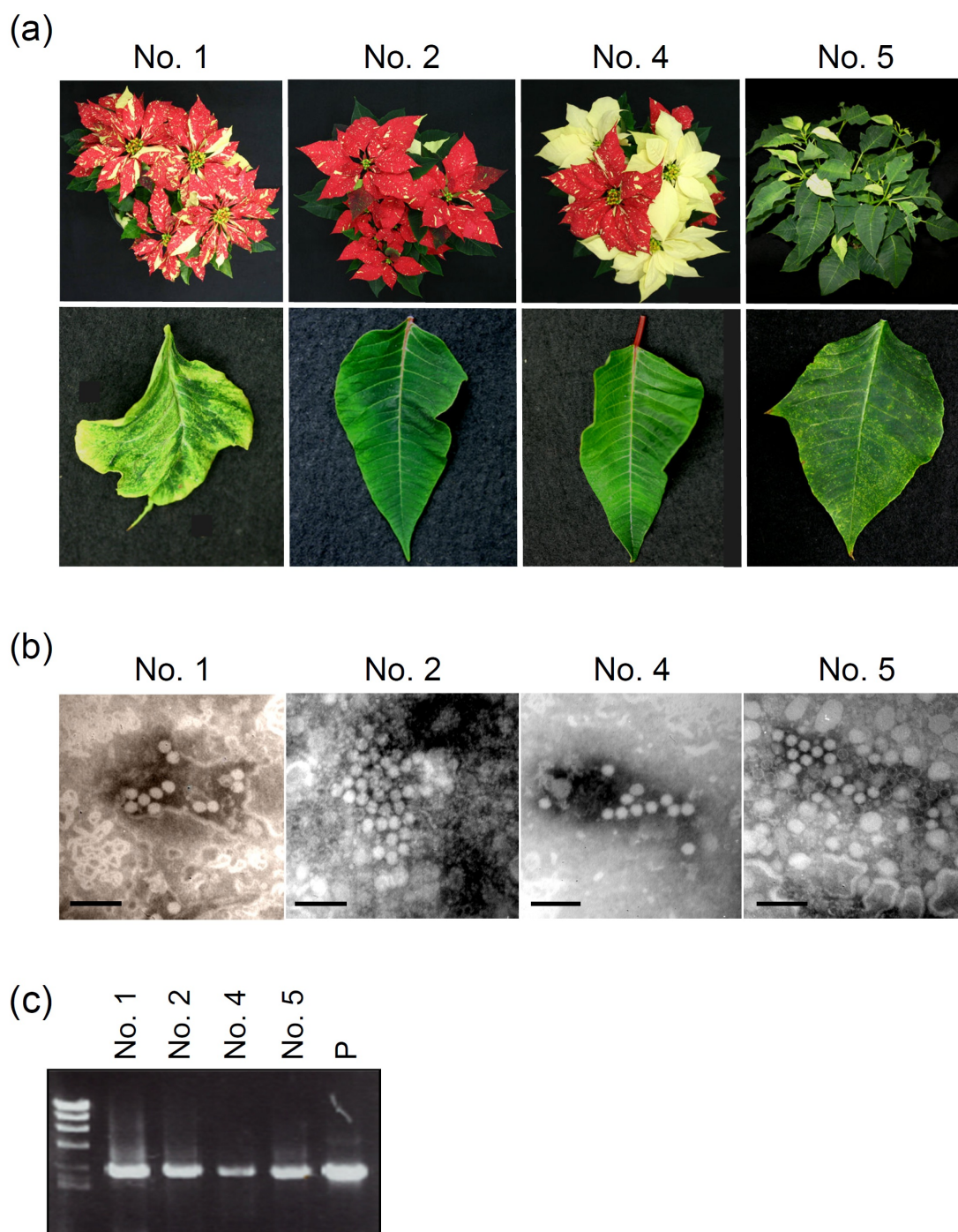


図 2.5 本研究で供試したポインセチアの写真および PnMV 特異的 RT-PCR 産物の電気泳動像

(a)ポインセチアの全体（上段）および葉（下段）の写真。(b) それぞれの株から精製された PnMV ウイルス粒子の電子顕微鏡写真。直径約 25 nm の球状粒子が観察された。バーは 100 nm。(c) ウイルス粒子から抽出した RNA をテンプレートに Oligo dT プライマーおよび PnMV 特異的プライマーセット (PnMV-2211F、PnMV-3750R) を用いて行った RT-PCR の増幅産物の電気泳動像。P は PnMV 感染植物の RNA を用いた場合 (ポジティブコントロール)。

### 3.2.2 ウイルスゲノム構造解析

決定した各配列を遺伝子解析ソフトウェア GENETYX v3.2 (GENETYX Corp.) によって解析した (図 2.6)。4つの PnMV-JO 分離株のゲノムは、81-6,026 番目の塩基、PnMV-JN のゲノムは 84-6,044 番目の塩基にかけて一つの大きな ORF を持ち、それぞれ 1,981 アミノ酸および 1,986 アミノ酸からなる推定分子量約 220 kDa のタンパク質をコードすると考えられた。blastp 検索の結果、当該アミノ酸配列上には、これまでに知られている RdRp の 4つの保存ドメインである、メチルトランスフェラーゼドメイン (methyltransferase domain; MTR)、パパイン様プロテアーゼドメイン (papain-like protease domain; PRO)、ヘリカーゼドメイン (helicase domain; HEL)、レプリカーゼドメイン (replicase domain; REP) および CP の保存配列が存在していた。これにより、単一の ORF には、既報の PnMV 分離株と同様に、RdRp と CP が融合したポリタンパク質がコードされていると考えられた。CP 部位は PnMV-G との比較により、4つの PnMV-JO 分離株は 5,451-5,453 番目、JN 分離株は 5,442-5,444 番目の AUG から始まると考えられた (Bradel et al., 2000)。次いで PnMV-G、-Nor の配列と比較した結果、4つの PnMV-JO および PnMV-JN は全塩基配列で 96%以上、CP のアミノ酸配列で 94%以上の相同性を示し (表 2.3 (a), (c))、*Tymovirus* 科の 3属における同種と別種の境界基準 (全塩基配列の相同性で 80%、CP のアミノ酸配列の相同性で 90%) を上回っており、配列を決定したいずれの分離株も PnMV の分離株であると考えられた (Dreher et al., 2000)。

アライメント図を作成したところ、興味深いことに、JO と JN の分離株間の比較では、ゲノムの RdRp コード領域に 9塩基の散在した挿入/欠失が見られた (図 2.6)。その結果、タンパク質の読み枠にずれが生じ (フレームシフト)、JO と JN の分離株間では MTR-PRO 間のアミノ酸配列が大きく異なっていた (図 2.7)。また、CP 領域にも 1塩基の挿入/欠失が見られ、フレームシフトが起こっていた (図 2.6; 図 2.7)。



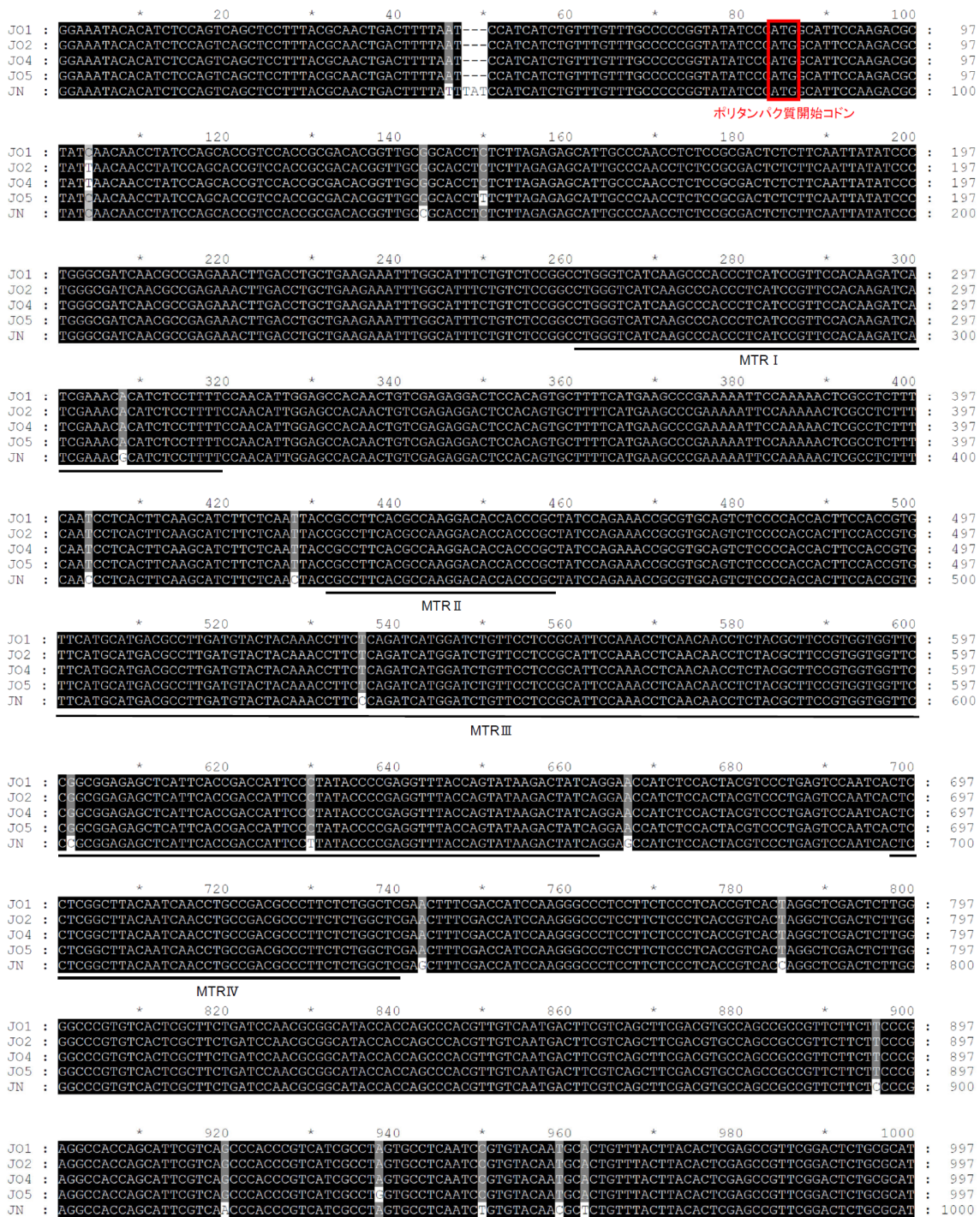


図 2.6 PhMV-JO1, -JO2, -JO4, -JO5, -JN の全塩基配列のアライメント図

下線を引いた部位は保存ドメイン内で保存されているモチーフ領域。青色で示した部分はプロテアーゼ活性に必須とされるシステインとヒスチジンをコードするコドン。紫色および黄緑色で示した部分はそれぞれ tymbobox および initiation box と推定される領域。▲は RdRp の MTR-PRO ドメイン間領域に見出された塩基挿入/欠失箇所。△は CP 領域に見出された塩基挿入/欠失箇所。

\* 1020 \* 1040 \* 1060 \* 1080 \* 1100  
 J01 : CTCGGATCCAGTGGGTTGGTTCGCACACAGTCCAAACAGCCAGAGCAGCGCTGGTTCAGTCCCGCTGGGACAATCTCCAGCACATTTCTCTCCTC : 1097  
 J02 : CTCGGATCCAGTGGGTTGGTTCGCACACAGTCCAAACAGCCAGAGCAGCGCTGGTTCAGTCCCGCTGGGACAATCTCCAGCACATTTCTCTCCTC : 1097  
 J04 : CTCGGATCCAGTGGGTTGGTTCGCACACAGTCCAAACAGCCAGAGCAGCGCTGGTTCAGTCCCGCTGGGACAATCTCCAGCACATTTCTCTCCTC : 1097  
 J05 : CTCGGATCCAGTGGGTTGGTTCGCACACAGTCCAAACAGCCAGAGCAGCGCTGGTTCAGTCCCGCTGGGACAATCTCCAGCACATTTCTCTCCTC : 1097  
 JN : CTCGGATCCAGTGGGTTGGTTCGCACACAGTCCAAACAGCCAGAGCAGCGCTGGTTCAGTCCCGCTGGGACAATCTCCAGCACATTTCTCTCCTC : 1100

\* 1120 \* 1140 \* 1160 \* 1180 \* 1200  
 J01 : ACTGCCCTAACCGTCTTCCAACCTCCTATTCCTGGAATGGCAGCCTTGGCAGCGCTTCATCTCTCGCTGCAAAACAGTGGTCGCTGAGTTGAAATCTTT : 1197  
 J02 : ACTGCCCTAACCGTCTTCCAACCTCCTATTCCTGGAATGGCAGCCTTGGCAGCGCTTCATCTCTCGCTGCAAAACAGTGGTCGCTGAGTTGAAATCTTT : 1197  
 J04 : ACTGCCCTAACCGTCTTCCAACCTCCTATTCCTGGAATGGCAGCCTTGGCAGCGCTTCATCTCTCGCTGCAAAACAGTGGTCGCTGAGTTGAAATCTTT : 1197  
 J05 : ACTGCCCTAACCGTCTTCCAACCTCCTATTCCTGGAATGGCAGCCTTGGCAGCGCTTCATCTCTCGCTGCAAAACAGTGGTCGCTGAGTTGAAATCTTT : 1197  
 JN : ACTGCCCTAACCGTCTTCCAACCTCCTATTCCTGGAATGGCAGCCTTGGCAGCGCTTCATCTCTCGCTGCAAAACAGTGGTCGCTGAGTTGAAATCTTT : 1200

\* 1220 \* 1240 \* 1260 \* 1280 \* 1300  
 J01 : CAGCCATCTTTCACCTTCTCCATCACCACCTTCTCTTCTCTCTCCTTTTCCAGTACTTCGGTCGAAAATCTGCTACCTCCAGGCTTTTGCCTAGCAACCT : 1297  
 J02 : CAGCCATCTTTCACCTTCTCCATCACCACCTTCTCTTCTCTCTCCTTTTCCAGTACTTCGGTCGAAAATCTGCTACCTCCAGGCTTTTGCCTAGCAACCT : 1297  
 J04 : CAGCCATCTTTCACCTTCTCCATCACCACCTTCTCTTCTCTCTCCTTTTCCAGTACTTCGGTCGAAAATCTGCTACCTCCAGGCTTTTGCCTAGCAACCT : 1297  
 J05 : CAGCCATCTTTCACCTTCTCCATCACCACCTTCTCTTCTCTCTCCTTTTCCAGTACTTCGGTCGAAAATCTGCTACCTCCAGGCTTTTGCCTAGCAACCT : 1297  
 JN : CAGCCATCTTTCACCTTCTCCATCACCACCTTCTCTTCTCTCTCCTTTTCCAGTACTTCGGTCGAAAATCTGCTACCTCCAGGCTTTTGCCTAGCAACCT : 1300

\* 1320 \* 1340 \* 1360 \* 1380 \* 1400  
 J01 : CGGTTTCGGAGTTTGGAGCAGCATTCAAGCTCCATGAAGGCTCTCTCCAGGCTGGTTTTAGTTATACACACACTTCCCAAACCCGCCAGGGCCCTCGA : 1397  
 J02 : CGGTTTCGGAGTTTGGAGCAGCATTCAAGCTCCATGAAGGCTCTCTCCAGGCTGGTTTTAGTTATACACACACTTCCCAAACCCGCCAGGGCCCTCGA : 1397  
 J04 : CGGTTTCGGAGTTTGGAGCAGCATTCAAGCTCCATGAAGGCTCTCTCCAGGCTGGTTTTAGTTATACACACACTTCCCAAACCCGCCAGGGCCCTCGA : 1397  
 J05 : CGGTTTCGGAGTTTGGAGCAGCATTCAAGCTCCATGAAGGCTCTCTCCAGGCTGGTTTTAGTTATACACACACTTCCCAAACCCGCCAGGGCCCTCGA : 1397  
 JN : CGGTTTCGGAGTTTGGAGCAGCATTCAAGCTCCATGAAGGCTCTCTCCAGGCTGGTTTTAGTTATACACACACTTCCCAAACCCGCCAGGGCCCTCGA : 1400

\* 1420 \* 1440 \* 1460 \* 1480 \* 1500  
 J01 : GATTTCTACCACAGGGCCGCTGAGCGATTCAAATTCATGTCGCCCTCGTTCGTTCCATCTCTCTCTCTCTCCCTCTCTGGGTTCCGCATTTACTTCCA : 1497  
 J02 : GATTTCTACCACAGGGCCGCTGAGCGATTCAAATTCATGTCGCCCTCGTTCGTTCCATCTCTCTCTCTCTCCCTCTCTGGGTTCCGCATTTACTTCCA : 1497  
 J04 : GATTTCTACCACAGGGCCGCTGAGCGATTCAAATTCATGTCGCCCTCGTTCGTTCCATCTCTCTCTCTCTCCCTCTCTGGGTTCCGCATTTACTTCCA : 1497  
 J05 : GATTTCTACCACAGGGCCGCTGAGCGATTCAAATTCATGTCGCCCTCGTTCGTTCCATCTCTCTCTCTCTCCCTCTCTGGGTTCCGCATTTACTTCCA : 1497  
 JN : GATTTCTACCACAGGGCCGCTGAGCGATTCAAATTCATGTCGCCCTCGTTCGTTCCATCTCTCTCTCTCTCCCTCTCTGGGTTCCGCATTTACTTCCA : 1500

\* 1520 \* 1540 \* 1560 \* 1580 \* 1600  
 J01 : AGTGCACGACGCCCATGCCCTCAGAGCCTTACAGGATTCCTACCACAAATACCATATCCAAGCAAGTGGGTCTTGGATGGAGTCGCCGGCTCACCTGT : 1597  
 J02 : AGTGCACGACGCCCATGCCCTCAGAGCCTTACAGGATTCCTACCACAAATACCATATCCAAGCAAGTGGGTCTTGGATGGAGTCGCCGGCTCACCTGT : 1597  
 J04 : AGTGCACGACGCCCATGCCCTCAGAGCCTTACAGGATTCCTACCACAAATACCATATCCAAGCAAGTGGGTCTTGGATGGAGTCGCCGGCTCACCTGT : 1597  
 J05 : AGTGCACGACGCCCATGCCCTCAGAGCCTTACAGGATTCCTACCACAAATACCATATCCAAGCAAGTGGGTCTTGGATGGAGTCGCCGGCTCACCTGT : 1597  
 JN : AGTGCACGACGCCCATGCCCTCAGAGCCTTACAGGATTCCTACCACAAATACCATATCCAAGCAAGTGGGTCTTGGATGGAGTCGCCGGCTCACCTGT : 1600

\* 1620 \* 1640 \* 1660 \* 1680 \* 1700  
 J01 : GGTCACTCCCGAGGCTTCTCTGCTTTCCGAACCTGTTCCAATCCCTGGCGAGCCAATGCGGCCAATGGACCCCGGCCCCCTCCAGGGCTGTGTGAT : 1697  
 J02 : GGTCACTCCCGAGGCTTCTCTGCTTTCCGAACCTGTTCCAATCCCTGGCGAGCCAATGCGGCCAATGGACCCCGGCCCCCTCCAGGGCTGTGTGAT : 1697  
 J04 : GGTCACTCCCGAGGCTTCTCTGCTTTCCGAACCTGTTCCAATCCCTGGCGAGCCAATGCGGCCAATGGACCCCGGCCCCCTCCAGGGCTGTGTGAT : 1697  
 J05 : GGTCACTCCCGAGGCTTCTCTGCTTTCCGAACCTGTTCCAATCCCTGGCGAGCCAATGCGGCCAATGGACCCCGGCCCCCTCCAGGGCTGTGTGAT : 1697  
 JN : GGTCACTCCCGAGGCTTCTCTGCTTTCCGAACCTGTTCCAATCCCTGGCGAGCCAATGCGGCCAATGGACCCCGGCCCCCTCCAGGGCTGTGTGAT : 1699

▲

\* 1720 \* 1740 \* 1760 \* 1780 \* 1800  
 J01 : CTCGCCCTCAGATGAGAACTCCTTTGGTGGCCGAGCAGCGGCTCGTTACCGGGCAATCGACATCACCATAACAATAAAGGCTCCGATTTTCCCTTGGC : 1797  
 J02 : CTCGCCCTCAGATGAGAACTCCTTTGGTGGCCGAGCAGCGGCTCGTTACCGGGCAATCGACATCACCATAACAATAAAGGCTCCGATTTTCCCTTGGC : 1797  
 J04 : CTCGCCCTCAGATGAGAACTCCTTTGGTGGCCGAGCAGCGGCTCGTTACCGGGCAATCGACATCACCATAACAATAAAGGCTCCGATTTTCCCTTGGC : 1797  
 J05 : CTCGCCCTCAGATGAGAACTCCTTTGGTGGCCGAGCAGCGGCTCGTTACCGGGCAATCGACATCACCATAACAATAAAGGCTCCGATTTTCCCTTGGC : 1797  
 JN : CTCGCCCTCAGATGAGAACTCCTTTGGTGGCCGAGCAGCGGCTCGTTACCGGGCAATCGACATCACCATAACAATAAAGGCTCCGATTTTCCCTTGGC : 1799

\* 1820 \* 1840 \* 1860 \* 1880 \* 1900  
 J01 : ACACCTACACCGCTGAAGGATGTCCATATCTGCACCGATTACTGCGCTGACTTCAGTGGAAACAGAGAACCCCTGGCCAAACCAAGCCGCTCATCTCGA : 1897  
 J02 : ACACCTACACCGCTGAAGGATGTCCATATCTGCACCGATTACTGCGCTGACTTCAGTGGAAACAGAGAACCCCTGGCCAAACCAAGCCGCTCATCTCGA : 1897  
 J04 : ACACCTACACCGCTGAAGGATGTCCATATCTGCACCGATTACTGCGCTGACTTCAGTGGAAACAGAGAACCCCTGGCCAAACCAAGCCGCTCATCTCGA : 1897  
 J05 : ACACCTACACCGCTGAAGGATGTCCATATCTGCACCGATTACTGCGCTGACTTCAGTGGAAACAGAGAACCCCTGGCCAAACCAAGCCGCTCATCTCGA : 1897  
 JN : ACACCTACACCGCTGAAGGATGTCCATATCTGCACCGATTACTGCGCTGACTTCAGTGGAAACAGAGAACCCCTGGCCAAACCAAGCCGCTCATCTCGA : 1899

\* 1920 \* 1940 \* 1960 \* 1980 \* 2000  
 J01 : TGACCAAGAGGCGCAGGCGGAGGCCGCACTTGGCCCTCTCGCCCGGCTCAGAAACCAAGGCTGCGGCTGCTCAGCCCGGGAGGCCCTGAAGGTC : 1997  
 J02 : TGACCAAGAGGCGCAGGCGGAGGCCGCACTTGGCCCTCTCGCCCGGCTCAGAAACCAAGGCTGCGGCTGCTCAGCCCGGGAGGCCCTGAAGGTC : 1997  
 J04 : TGACCAAGAGGCGCAGGCGGAGGCCGCACTTGGCCCTCTCGCCCGGCTCAGAAACCAAGGCTGCGGCTGCTCAGCCCGGGAGGCCCTGAAGGTC : 1997  
 J05 : TGACCAAGAGGCGCAGGCGGAGGCCGCACTTGGCCCTCTCGCCCGGCTCAGAAACCAAGGCTGCGGCTGCTCAGCCCGGGAGGCCCTGAAGGTC : 1997  
 JN : TGACCAAGAGGCGCAGGCGGAGGCCGCACTTGGCCCTCTCGCCCGGCTCAGAAACCAAGGCTGCGGCTGCTCAGCCCGGGAGGCCCTGAAGGTC : 1997

\* 2020 \* 2040 \* 2060 \* 2080 \* 2100  
 J01 : CTTTCAGCCGCCACCCGCAAGAGGCGGATCCAGCACCCCAAAAACTCGACGATTAACACCTACTCTCTGATGGGGCCGACCAAGTGTACCCGCTG : 2097  
 J02 : CTTTCAGCCGCCACCCGCAAGAGGCGGATCCAGCACCCCAAAAACTCGACGATTAACACCTACTCTCTGATGGGGCCGACCAAGTGTACCCGCTG : 2097  
 J04 : CTTTCAGCCGCCACCCGCAAGAGGCGGATCCAGCACCCCAAAAACTCGACGATTAACACCTACTCTCTGATGGGGCCGACCAAGTGTACCCGCTG : 2097  
 J05 : CTTTCAGCCGCCACCCGCAAGAGGCGGATCCAGCACCCCAAAAACTCGACGATTAACACCTACTCTCTGATGGGGCCGACCAAGTGTACCCGCTG : 2097  
 JN : CTTTCAGCCGCCACCCGCAAGAGGCGGATCCAGCACCCCAAAAACTCGACGATTAACACCTACTCTCTGATGGGGCCGACCAAGTGTACCCGCTG : 2096

\* 2120 \* 2140 \* 2160 \* 2180 \* 2200  
 J01 : ATGAGCATGGTGACCTCCCTCCCAATCTCCACAGGAGGCTGCTCTCGGAAATCAGCCAGCTTATGGTCGACCCACCGCTTAAAGGGCGGTTTCAGACCTT : 2197  
 J02 : ATGAGCATGGTGACCTCCCTCCCAATCTCCACAGGAGGCTGCTCTCGGAAATCAGCCAGCTTATGGTCGACCCACCGCTTAAAGGGCGGTTTCAGACCTT : 2197  
 J04 : ATGAGCATGGTGACCTCCCTCCCAATCTCCACAGGAGGCTGCTCTCGGAAATCAGCCAGCTTATGGTCGACCCACCGCTTAAAGGGCGGTTTCAGACCTT : 2197  
 J05 : ATGAGCATGGTGACCTCCCTCCCAATCTCCACAGGAGGCTGCTCTCGGAAATCAGCCAGCTTATGGTCGACCCACCGCTTAAAGGGCGGTTTCAGACCTT : 2197  
 JN : ATGAGCATGGTGACCTCCCTCCCAATCTCCACAGGAGGCTGCTCTCGGAAATCAGCCAGCTTATGGTCGACCCACCGCTTAAAGGGCGGTTTCAGACCTT : 2193

図 2.6 続き



JO1 : \* 2220 \* 2240 \* 2260 \* 2280 \* 2300  
 JO2 : \* 2320 \* 2340 \* 2360 \* 2380 \* 2400  
 JO4 : \* 2420 \* 2440 \* 2460 \* 2480 \* 2500  
 JO5 : \* 2520 \* 2540 \* 2560 \* 2580 \* 2600  
 JO1 : \* 2620 \* 2640 \* 2660 \* 2680 \* 2700  
 JO2 : \* 2720 \* 2740 \* 2760 \* 2780 \* 2800  
 JO4 : \* 2820 \* 2840 \* 2860 \* 2880 \* 2900  
 JO1 : \* 2920 \* 2940 \* 2960 \* 2980 \* 3000  
 JO2 : \* 3020 \* 3040 \* 3060 \* 3080 \* 3100  
 JO4 : \* 3120 \* 3140 \* 3160 \* 3180 \* 3200  
 JO5 : \* 3220 \* 3240 \* 3260 \* 3280 \* 3300

JO1 : **CGCACACTCTACCCCGGAACTATATAGGAACCTCCGCTGACTTCTCTCACTCGCCCTCGGCAACGGCCCGCCCAAGCCGTGTC** : 2297  
 JO2 : **CGCACACTCTACCCCGGAACTATATAGGAACCTCCGCTGACTTCTCTCACTCGCCCTCGGCAACGGCCCGCCCAAGCCGTGTC** : 2297  
 JO4 : **CGCACACTCTACCCCGGAACTATATAGGAACCTCCGCTGACTTCTCTCACTCGCCCTCGGCAACGGCCCGCCCAAGCCGTGTC** : 2297  
 JO5 : **CGCACACTCTACCCCGGAACTATATAGGAACCTCCGCTGACTTCTCTCACTCGCCCTCGGCAACGGCCCGCCCAAGCCGTGTC** : 2297  
 JN : **G--CACACTCTACCCCGGAACTATATAGGAACCTCCGCTGACTTCTCTCACTCGCCCTCGGCAACGGCCCGCCCAAGCCGTGTC** : 2291

**89**  
 JO1 : **AGTGCCTCTTAGTGGCAATCAGCAAAGCCACCTCCATCTCGCTCGAAGAGTTGTGGAAGACCCCTCGCTGCCCTCCTGCCCGATTCT** : 2397  
 JO2 : **AGTGCCTCTTAGTGGCAATCAGCAAAGCCACCTCCATCTCGCTCGAAGAGTTGTGGAAGACCCCTCGCTGCCCTCCTGCCCGATTCT** : 2397  
 JO4 : **AGTGCCTCTTAGTGGCAATCAGCAAAGCCACCTCCATCTCGCTCGAAGAGTTGTGGAAGACCCCTCGCTGCCCTCCTGCCCGATTCT** : 2397  
 JO5 : **AGTGCCTCTTAGTGGCAATCAGCAAAGCCACCTCCATCTCGCTCGAAGAGTTGTGGAAGACCCCTCGCTGCCCTCCTGCCCGATTCT** : 2397  
 JN : **AGTGCCTCTTAGTGGCAATCAGCAAAGCCACCTCCATCTCGCTCGAAGAGTTGTGGAAGACCCCTCGCTGCCCTCCTGCCCGATTCT** : 2391

Cys

JO1 : **AGGACATAACGACCCCGGCCCTCTCCACGGACCACTTCGTAGTCTTAGCTTCCGCCCACTCTTTGAAGTGCATTTTCATCTCTGGGCGCT** : 2497  
 JO2 : **AGGACATAACGACCCCGGCCCTCTCCACGGACCACTTCGTAGTCTTAGCTTCCGCCCACTCTTTGAAGTGCATTTTCATCTCTGGGCGCT** : 2497  
 JO4 : **AGGACATAACGACCCCGGCCCTCTCCACGGACCACTTCGTAGTCTTAGCTTCCGCCCACTCTTTGAAGTGCATTTTCATCTCTGGGCGCT** : 2497  
 JO5 : **AGGACATAACGACCCCGGCCCTCTCCACGGACCACTTCGTAGTCTTAGCTTCCGCCCACTCTTTGAAGTGCATTTTCATCTCTGGGCGCT** : 2497  
 JN : **AGGACATAACGACCCCGGCCCTCTCCACGGACCACTTCGTAGTCTTAGCTTCCGCCCACTCTTTGAAGTGCATTTTCATCTCTGGGCGCT** : 2491

JO1 : **GTAGGCCCTCCACAACGCACACCCTCCTTCAGATCAAGCAACAAGTCTGGTAATCAACTGCACACTTCGAGCTCGTCGGGATGGGACCGGGCC** : 2597  
 JO2 : **GTAGGCCCTCCACAACGCACACCCTCCTTCAGATCAAGCAACAAGTCTGGTAATCAACTGCACACTTCGAGCTCGTCGGGATGGGACCGGGCC** : 2597  
 JO4 : **GTAGGCCCTCCACAACGCACACCCTCCTTCAGATCAAGCAACAAGTCTGGTAATCAACTGCACACTTCGAGCTCGTCGGGATGGGACCGGGCC** : 2597  
 JO5 : **GTAGGCCCTCCACAACGCACACCCTCCTTCAGATCAAGCAACAAGTCTGGTAATCAACTGCACACTTCGAGCTCGTCGGGATGGGACCGGGCC** : 2597  
 JN : **GTAGGCCCTCCACAACGCACACCCTCCTTCAGATCAAGCAACAAGTCTGGTAATCAACTGCACACTTCGAGCTCGTCGGGATGGGACCGGGCC** : 2591

His

JO1 : **CTTCGAGGCGCGCCAGCGATACGAAGGAATTGAACCGGGCGCCCTGGGTTCAAATTCAGAAGCGCTTCTCCCGTTTCGCAAGTCCATGCTAC** : 2697  
 JO2 : **CTTCGAGGCGCGCCAGCGATACGAAGGAATTGAACCGGGCGCCCTGGGTTCAAATTCAGAAGCGCTTCTCCCGTTTCGCAAGTCCATGCTAC** : 2697  
 JO4 : **CTTCGAGGCGCGCCAGCGATACGAAGGAATTGAACCGGGCGCCCTGGGTTCAAATTCAGAAGCGCTTCTCCCGTTTCGCAAGTCCATGCTAC** : 2697  
 JO5 : **CTTCGAGGCGCGCCAGCGATACGAAGGAATTGAACCGGGCGCCCTGGGTTCAAATTCAGAAGCGCTTCTCCCGTTTCGCAAGTCCATGCTAC** : 2697  
 JN : **CTTCGAGGCGCGCCAGCGATACGAAGGAATTGAACCGGGCGCCCTGGGTTCAAATTCAGAAGCGCTTCTCCCGTTTCGCAAGTCCATGCTAC** : 2688

JO1 : **CCACGGAAACCCGATCGCGCAAGAATCTCATCTCAACATGAAGAATGGCTTCGATGGTGTCTCGCCAAACATTGACCCGAACCCCGCATGAAGCCCG** : 2797  
 JO2 : **CCACGGAAACCCGATCGCGCAAGAATCTCATCTCAACATGAAGAATGGCTTCGATGGTGTCTCGCCAAACATTGACCCGAACCCCGCATGAAGCCCG** : 2797  
 JO4 : **CCACGGAAACCCGATCGCGCAAGAATCTCATCTCAACATGAAGAATGGCTTCGATGGTGTCTCGCCAAACATTGACCCGAACCCCGCATGAAGCCCG** : 2797  
 JO5 : **CCACGGAAACCCGATCGCGCAAGAATCTCATCTCAACATGAAGAATGGCTTCGATGGTGTCTCGCCAAACATTGACCCGAACCCCGCATGAAGCCCG** : 2797  
 JN : **CCACGGAAACCCGATCGCGCAAGAATCTCATCTCAACATGAAGAATGGCTTCGATGGTGTCTCGCCAAACATTGACCCGAACCCCGCATGAAGCCCG** : 2788

JO1 : **TGACCGCTCCTTGCCCTTGACGGCAGTATTGAAGTGCACGCCCCAGAAAGGTAAGTCTGATTACCTAGCCGGGTTTCCAGGCTGCGGAAAGACCAAG** : 2897  
 JO2 : **TGACCGCTCCTTGCCCTTGACGGCAGTATTGAAGTGCACGCCCCAGAAAGGTAAGTCTGATTACCTAGCCGGGTTTCCAGGCTGCGGAAAGACCAAG** : 2897  
 JO4 : **TGACCGCTCCTTGCCCTTGACGGCAGTATTGAAGTGCACGCCCCAGAAAGGTAAGTCTGATTACCTAGCCGGGTTTCCAGGCTGCGGAAAGACCAAG** : 2897  
 JO5 : **TGACCGCTCCTTGCCCTTGACGGCAGTATTGAAGTGCACGCCCCAGAAAGGTAAGTCTGATTACCTAGCCGGGTTTCCAGGCTGCGGAAAGACCAAG** : 2897  
 JN : **TGACCGCTCCTTGCCCTTGACGGCAGTATTGAAGTGCACGCCCCAGAAAGGTAAGTCTGATTACCTAGCCGGGTTTCCAGGCTGCGGAAAGACCAAG** : 2888

HEL I

JO1 : **CCCATCCAGGCCCTCCCAAGACAGCCTTTTGGGATTAATAAGTGGCAGTGCCACCCTGGAGTTGCGGCCGAGTGGAAGCTGATCTGGCGCTTA** : 2997  
 JO2 : **CCCATCCAGGCCCTCCCAAGACAGCCTTTTGGGATTAATAAGTGGCAGTGCCACCCTGGAGTTGCGGCCGAGTGGAAGCTGATCTGGCGCTTA** : 2997  
 JO4 : **CCCATCCAGGCCCTCCCAAGACAGCCTTTTGGGATTAATAAGTGGCAGTGCCACCCTGGAGTTGCGGCCGAGTGGAAGCTGATCTGGCGCTTA** : 2997  
 JO5 : **CCCATCCAGGCCCTCCCAAGACAGCCTTTTGGGATTAATAAGTGGCAGTGCCACCCTGGAGTTGCGGCCGAGTGGAAGCTGATCTGGCGCTTA** : 2997  
 JN : **CCCATCCAGGCCCTCCCAAGACAGCCTTTTGGGATTAATAAGTGGCAGTGCCACCCTGGAGTTGCGGCCGAGTGGAAGCTGATCTGGCGCTTA** : 2988

HEL I a

JO1 : **AAACCGGCCAGGCTTGGAGACTTCCACTTGGGAGTCTCCTTGCCTCAAGACCGCCCTCATTCTTGTCAATTGATGAGGTGTACAAAATGCCCCGGGTTA** : 3097  
 JO2 : **AAACCGGCCAGGCTTGGAGACTTCCACTTGGGAGTCTCCTTGCCTCAAGACCGCCCTCATTCTTGTCAATTGATGAGGTGTACAAAATGCCCCGGGTTA** : 3097  
 JO4 : **AAACCGGCCAGGCTTGGAGACTTCCACTTGGGAGTCTCCTTGCCTCAAGACCGCCCTCATTCTTGTCAATTGATGAGGTGTACAAAATGCCCCGGGTTA** : 3097  
 JO5 : **AAACCGGCCAGGCTTGGAGACTTCCACTTGGGAGTCTCCTTGCCTCAAGACCGCCCTCATTCTTGTCAATTGATGAGGTGTACAAAATGCCCCGGGTTA** : 3097  
 JN : **AAACCGGCCAGGCTTGGAGACTTCCACTTGGGAGTCTCCTTGCCTCAAGACCGCCCTCATTCTTGTCAATTGATGAGGTGTACAAAATGCCCCGGGTTA** : 3088

HEL II

JO1 : **TGTGGATTTGGCGGTAGCAGCTGATCCTACCGTCCGTTTGTGATCTCTTTGGGTGACCCCTTCAAGGGGAGTATCACAGCTCCCATCCGGAATCCCAG** : 3197  
 JO2 : **TGTGGATTTGGCGGTAGCAGCTGATCCTACCGTCCGTTTGTGATCTCTTTGGGTGACCCCTTCAAGGGGAGTATCACAGCTCCCATCCGGAATCCCAG** : 3197  
 JO4 : **TGTGGATTTGGCGGTAGCAGCTGATCCTACCGTCCGTTTGTGATCTCTTTGGGTGACCCCTTCAAGGGGAGTATCACAGCTCCCATCCGGAATCCCAG** : 3197  
 JO5 : **TGTGGATTTGGCGGTAGCAGCTGATCCTACCGTCCGTTTGTGATCTCTTTGGGTGACCCCTTCAAGGGGAGTATCACAGCTCCCATCCGGAATCCCAG** : 3197  
 JN : **TGTGGATTTGGCGGTAGCAGCTGATCCTACCGTCCGTTTGTGATCTCTTTGGGTGACCCCTTCAAGGGGAGTATCACAGCTCCCATCCGGAATCCCAG** : 3188

HEL III

JO1 : **AATAAGCCACTCTCTCCGGAGATCCACAGGCTGCTCAAGTACATCGACTGTTATTGGCTCTGGTCTCACCGAATCCCTCAATGCGTCGCGCGTGTTCG** : 3297  
 JO2 : **AATAAGCCACTCTCTCCGGAGATCCACAGGCTGCTCAAGTACATCGACTGTTATTGGCTCTGGTCTCACCGAATCCCTCAATGCGTCGCGCGTGTTCG** : 3297  
 JO4 : **AATAAGCCACTCTCTCCGGAGATCCACAGGCTGCTCAAGTACATCGACTGTTATTGGCTCTGGTCTCACCGAATCCCTCAATGCGTCGCGCGTGTTCG** : 3297  
 JO5 : **AATAAGCCACTCTCTCCGGAGATCCACAGGCTGCTCAAGTACATCGACTGTTATTGGCTCTGGTCTCACCGAATCCCTCAATGCGTCGCGCGTGTTCG** : 3297  
 JN : **AATAAGCCACTCTCTCCGGAGATCCACAGGCTGCTCAAGTACATCGACTGTTATTGGCTCTGGTCTCACCGAATCCCTCAATGCGTCGCGCGTGTTCG** : 3288

HEL IV

図 2.6 続き

```

J01 : * 3320 * 3340 * 3360 * 3380 * 3400
J02 : GGGTTGAGAGCTCAAACGAGCAGGAAGGTTACGTGGGCTTCAGCTCCTTTATCGCACCTCAGGACATACCCCTCGCTTGCTCGGAGAGCTCAGCCAAAGC : 3397
J04 : GGGTTGAGAGCTCAAACGAGCAGGAAGGTTACGTGGGCTTCAGCTCCTTTATCGCACCTCAGGACATACCCCTCGCTTGCTCGGAGAGCTCAGCCAAAGC : 3397
J05 : GGGTTGAGAGCTCAAACGAGCAGGAAGGTTACGTGGGCTTCAGCTCCTTTATCGCACCTCAGGACATACCCCTCGCTTGCTCGGAGAGCTCAGCCAAAGC : 3397
JN : GGGTTGAGAGCTCAAACGAGCAGGAAGGTTACGTGGGCTTCAGCTCCTTTATCGCACCTCAGGACATACCCCTCGCTTGCTCGGAGAGCTCAGCCAAAGC : 3388

J01 : * 3420 * 3440 * 3460 * 3480 * 3500
J02 : CTTGGCGGACGCCGGTACCCCTGCCACCACCGTCAGTAGCTCTCAAGGTTCCACTTACCGCACCCCAATCAATCTTCTCCTCGACAGAAACAGTCCGAGA : 3497
J04 : CTTGGCGGACGCCGGTACCCCTGCCACCACCGTCAGTAGCTCTCAAGGTTCCACTTACCGCACCCCAATCAATCTTCTCCTCGACAGAAACAGTCCGAGA : 3497
J05 : CTTGGCGGACGCCGGTACCCCTGCCACCACCGTCAGTAGCTCTCAAGGTTCCACTTACCGCACCCCAATCAATCTTCTCCTCGACAGAAACAGTCCGAGA : 3497
JN : CTTGGCGGACGCCGGTACCCCTGCCACCACCGTCAGTAGCTCTCAAGGTTCCACTTACCGCACCCCAATCAATCTTCTCCTCGACAGAAACAGTCCGAGA : 3488

HEL V
J01 : * 3520 * 3540 * 3560 * 3580 * 3600
J02 : CTGAGCAGCGCCGCTCGCTGGTTCGCGGCCACTTCGTTCCACCATGGCCATAAACAATGACGGGGCGATCGGGATGTTCTACAACAGGGCCACACAACAAC : 3597
J04 : CTGAGCAGCGCCGCTCGCTGGTTCGCGGCCACTTCGTTCCACCATGGCCATAAACAATGACGGGGCGATCGGGATGTTCTACAACAGGGCCACACAACAAC : 3597
J05 : CTGAGCAGCGCCGCTCGCTGGTTCGCGGCCACTTCGTTCCACCATGGCCATAAACAATGACGGGGCGATCGGGATGTTCTACAACAGGGCCACACAACAAC : 3597
JN : CTGAGCAGCGCCGCTCGCTGGTTCGCGGCCACTTCGTTCCACCATGGCCATAAACAATGACGGGGCGATCGGGATGTTCTACAACAGGGCCACACAACAAC : 3588

HEL VI
J01 : * 3620 * 3640 * 3660 * 3680 * 3700
J02 : CGGTGTTCTCTGCTTTTACAACGCCAATCTGATATCCCTGCACAGCCTGTTCACCAACGCTTTTCGCGAAGTTGCCGATTTATACGCACCCGGATCACCAG : 3697
J04 : CGGTGTTCTCTGCTTTTACAACGCCAATCTGATATCCCTGCACAGCCTGTTCACCAACGCTTTTCGCGAAGTTGCCGATTTATACGCACCCGGATCACCAG : 3697
J05 : CGGTGTTCTCTGCTTTTACAACGCCAATCTGATATCCCTGCACAGCCTGTTCACCAACGCTTTTCGCGAAGTTGCCGATTTATACGCACCCGGATCACCAG : 3697
JN : CGGTGTTCTCTGCTTTTACAACGCCAATCTGATATCCCTGCACAGCCTGTTCACCAACGCTTTTCGCGAAGTTGCCGATTTATACGCACCCGGATCACCAG : 3688

J01 : * 3720 * 3740 * 3760 * 3780 * 3800
J02 : TCGTAGGGGCATGCTACCGGTGGCAACAACCTTCGTTGAGGACGAGCTTATCATTTGATTCAGAAGTCCCGGGCCCGTGAATGGCCAGAGTTCGAGGAT : 3797
J04 : TCGTAGGGGCATGCTACCGGTGGCAACAACCTTCGTTGAGGACGAGCTTATCATTTGATTCAGAAGTCCCGGGCCCGTGAATGGCCAGAGTTCGAGGAT : 3797
J05 : TCGTAGGGGCATGCTACCGGTGGCAACAACCTTCGTTGAGGACGAGCTTATCATTTGATTCAGAAGTCCCGGGCCCGTGAATGGCCAGAGTTCGAGGAT : 3797
JN : TCGTAGGGGCATGCTACCGGTGGCAACAACCTTCGTTGAGGACGAGCTTATCATTTGATTCAGAAGTCCCGGGCCCGTGAATGGCCAGAGTTCGAGGAT : 3788

J01 : * 3820 * 3840 * 3860 * 3880 * 3900
J02 : ACTTTCCTCCCGACTTGGCGAGCCCTCTTCACCCGGAATCTTCGCTCTGCTGTTCAGAGCAATTCGCCGGCCCAATCCACTTACGTCCTCCGGCCACCA : 3897
J04 : ACTTTCCTCCCGACTTGGCGAGCCCTCTTCACCCGGAATCTTCGCTCTGCTGTTCAGAGCAATTCGCCGGCCCAATCCACTTACGTCCTCCGGCCACCA : 3897
J05 : ACTTTCCTCCCGACTTGGCGAGCCCTCTTCACCCGGAATCTTCGCTCTGCTGTTCAGAGCAATTCGCCGGCCCAATCCACTTACGTCCTCCGGCCACCA : 3897
JN : ACTTTCCTCCCGACTTGGCGAGCCCTCTTCACCCGGAATCTTCGCTCTGCTGTTCAGAGCAATTCGCCGGCCCAATCCACTTACGTCCTCCGGCCACCA : 3888

J01 : * 3920 * 3940 * 3960 * 3980 * 4000
J02 : TCACTGCGGTTTATCTGGTGAATCCTTTGAGAATCTCGCAGCACATTTCCCTCCCGCTCAGGACCCGAAATTAAGGAGATCTTGCACCCGGCGGAGTT : 3997
J04 : TCACTGCGGTTTATCTGGTGAATCCTTTGAGAATCTCGCAGCACATTTCCCTCCCGCTCAGGACCCGAAATTAAGGAGATCTTGCACCCGGCGGAGTT : 3997
J05 : TCACTGCGGTTTATCTGGTGAATCCTTTGAGAATCTCGCAGCACATTTCCCTCCCGCTCAGGACCCGAAATTAAGGAGATCTTGCACCCGGCGGAGTT : 3997
JN : TCACTGCGGTTTATCTGGTGAATCCTTTGAGAATCTCGCAGCACATTTCCCTCCCGCTCAGGACCCGAAATTAAGGAGATCTTGCACCCGGCGGAGTT : 3988

J01 : * 4020 * 4040 * 4060 * 4080 * 4100
J02 : CAGTGGCGAGTTTCCGATCTCCTGAACCAGGATTTCTCTCTCCGCGCAGTCTCCACGTTGATTCGCGCAAGCATGACTCCAAGCGGACCCGAGC : 4097
J04 : CAGTGGCGAGTTTCCGATCTCCTGAACCAGGATTTCTCTCTCCGCGCAGTCTCCACGTTGATTCGCGCAAGCATGACTCCAAGCGGACCCGAGC : 4097
J05 : CAGTGGCGAGTTTCCGATCTCCTGAACCAGGATTTCTCTCTCCGCGCAGTCTCCACGTTGATTCGCGCAAGCATGACTCCAAGCGGACCCGAGC : 4097
JN : CAGTGGCGAGTTTCCGATCTCCTGAACCAGGATTTCTCTCTCCGCGCAGTCTCCACGTTGATTCGCGCAAGCATGACTCCAAGCGGACCCGAGC : 4088

J01 : * 4120 * 4140 * 4160 * 4180 * 4200
J02 : CTGCTCGTCCGCTCCATTACCAAGCGCTCCGTTCCGCGCCAGGACTCTTCGTACAGCTCTCCTCCAAGGACCAAAATTCGGGCTTGACCCCTCTACC : 4197
J04 : CTGCTCGTCCGCTCCATTACCAAGCGCTCCGTTCCGCGCCAGGACTCTTCGTACAGCTCTCCTCCAAGGACCAAAATTCGGGCTTGACCCCTCTACC : 4197
J05 : CTGCTCGTCCGCTCCATTACCAAGCGCTCCGTTCCGCGCCAGGACTCTTCGTACAGCTCTCCTCCAAGGACCAAAATTCGGGCTTGACCCCTCTACC : 4197
JN : CTGCTCGTCCGCTCCATTACCAAGCGCTCCGTTCCGCGCCAGGACTCTTCGTACAGCTCTCCTCCAAGGACCAAAATTCGGGCTTGACCCCTCTACC : 4188

J01 : * 4220 * 4240 * 4260 * 4280 * 4300
J02 : ACAGTTGGTGGCGAGCTTACAACCGCCACCCGAGGCAGTCTTCATTCGATGAGTTGCTGTTTGGGAGTGCATCAACATCAATGAGTTGGCGAGCT : 4297
J04 : ACAGTTGGTGGCGAGCTTACAACCGCCACCCGAGGCAGTCTTCATTCGATGAGTTGCTGTTTGGGAGTGCATCAACATCAATGAGTTGGCGAGCT : 4297
J05 : ACAGTTGGTGGCGAGCTTACAACCGCCACCCGAGGCAGTCTTCATTCGATGAGTTGCTGTTTGGGAGTGCATCAACATCAATGAGTTGGCGAGCT : 4297
JN : ACAGTTGGTGGCGAGCTTACAACCGCCACCCGAGGCAGTCTTCATTCGATGAGTTGCTGTTTGGGAGTGCATCAACATCAATGAGTTGGCGAGCT : 4288

J01 : * 4320 * 4340 * 4360 * 4380 * 4400
J02 : CTCGAAATGAGACCAAGAGCAGATCAATTGGGAACGCCAGCCGATCGGAACTGATGGCGCATCACAGCCGTAAATTTTCAGCAAAAACCGAGCACA : 4397
J04 : CTCGAAATGAGACCAAGAGCAGATCAATTGGGAACGCCAGCCGATCGGAACTGATGGCGCATCACAGCCGTAAATTTTCAGCAAAAACCGAGCACA : 4397
J05 : CTCGAAATGAGACCAAGAGCAGATCAATTGGGAACGCCAGCCGATCGGAACTGATGGCGCATCACAGCCGTAAATTTTCAGCAAAAACCGAGCACA : 4397
JN : CTCGAAATGAGACCAAGAGCAGATCAATTGGGAACGCCAGCCGATCGGAACTGATGGCGCATCACAGCCGTAAATTTTCAGCAAAAACCGAGCACA : 4388

```

REP I

図 2.6 続き



```

J01 : ATCAATGAAGCCTCCATCTTTGGATCCTGGAAGGCTTGTACAGCGCTGGCTCTCATGCATGATTATGTCGTTCTTTCTGGTCCGGTCAAGAAATAAC : 4497
J02 : ATCAATGAAGCCTCCATCTTTGGATCCTGGAAGGCTTGTACAGCGCTGGCTCTCATGCATGATTATGTCGTTCTTTCTGGTCCGGTCAAGAAATAAC : 4497
J04 : ATCAATGAAGCCTCCATCTTTGGATCCTGGAAGGCTTGTACAGCGCTGGCTCTCATGCATGATTATGTCGTTCTTTCTGGTCCGGTCAAGAAATAAC : 4497
J05 : ATCAATGAAGCCTCCATCTTTGGATCCTGGAAGGCTTGTACAGCGCTGGCTCTCATGCATGATTATGTCGTTCTTTCTGGTCCGGTCAAGAAATAAC : 4497
JN : ATCAATGAAGCCTCCATCTTTGGATCCTGGAAGGCTTGTACAGCGCTGGCTCTCATGCATGATTATGTCGTTCTTTCTGGTCCGGTCAAGAAATAAC : 4488

REP II
J01 : AGGCGCATCTTTGACTCCCAAGAGCGACCAAGCTGATTAACCATGCTGGCCACTCCOCTCTTGAGATGTCGGAGTGGGCCCAAAAGCACCTCAATC : 4597
J02 : AGGCGCATCTTTGACTCCCAAGAGCGACCAAGCTGATTAACCATGCTGGCCACTCCOCTCTTGAGATGTCGGAGTGGGCCCAAAAGCACCTCAATC : 4597
J04 : AGGCGCATCTTTGACTCCCAAGAGCGACCAAGCTGATTAACCATGCTGGCCACTCCOCTCTTGAGATGTCGGAGTGGGCCCAAAAGCACCTCAATC : 4597
J05 : AGGCGCATCTTTGACTCCCAAGAGCGACCAAGCTGATTAACCATGCTGGCCACTCCOCTCTTGAGATGTCGGAGTGGGCCCAAAAGCACCTCAATC : 4597
JN : AGGCGCATCTTTGACTCCCAAGAGCGACCAAGCTGATTAACCATGCTGGCCACTCCOCTCTTGAGATGTCGGAGTGGGCCCAAAAGCACCTCAATC : 4588

REP III
J01 : AGGAATCTCTCACACAAATGACTAGACGGCTTTGACCAAGCCAGCATGGCGAGGCGTTCGCTCTTCGAGATGGCCAAAGATGGCCGCTTGAGCATCCC : 4697
J02 : AGGAATCTCTCACACAAATGACTAGACGGCTTTGACCAAGCCAGCATGGCGAGGCGTTCGCTCTTCGAGATGGCCAAAGATGGCCGCTTGAGCATCCC : 4697
J04 : AGGAATCTCTCACACAAATGACTAGACGGCTTTGACCAAGCCAGCATGGCGAGGCGTTCGCTCTTCGAGATGGCCAAAGATGGCCGCTTGAGCATCCC : 4697
J05 : AGGAATCTCTCACACAAATGACTAGACGGCTTTGACCAAGCCAGCATGGCGAGGCGTTCGCTCTTCGAGATGGCCAAAGATGGCCGCTTGAGCATCCC : 4697
JN : AGGAATCTCTCACACAAATGACTAGACGGCTTTGACCAAGCCAGCATGGCGAGGCGTTCGCTCTTCGAGATGGCCAAAGATGGCCGCTTGAGCATCCC : 4688

REP IV
J01 : GAGAGCCTCATCAACCTTCATTCGTATCTCAAGCGCAATGTTGACACCCAGTTGGGCTCTAACGTGCATGAGCTCACCGGCGAACCAGGCACCTAAC : 4797
J02 : GAGAGCCTCATCAACCTTCATTCGTATCTCAAGCGCAATGTTGACACCCAGTTGGGCTCTAACGTGCATGAGCTCACCGGCGAACCAGGCACCTAAC : 4797
J04 : GAGAGCCTCATCAACCTTCATTCGTATCTCAAGCGCAATGTTGACACCCAGTTGGGCTCTAACGTGCATGAGCTCACCGGCGAACCAGGCACCTAAC : 4797
J05 : GAGAGCCTCATCAACCTTCATTCGTATCTCAAGCGCAATGTTGACACCCAGTTGGGCTCTAACGTGCATGAGCTCACCGGCGAACCAGGCACCTAAC : 4797
JN : GAGAGCCTCATCAACCTTCATTCGTATCTCAAGCGCAATGTTGACACCCAGTTGGGCTCTAACGTGCATGAGCTCACCGGCGAACCAGGCACCTAAC : 4788

REP V
J01 : ACGACAACACAGACTACAATCTCGGGTCATTTACAGCAAGTATCTGGTCTCGACACCACCAATCATGGTGTCCGGAGATGACAGCGTAAATGGGGAAA : 4897
J02 : ACGACAACACAGACTACAATCTCGGGTCATTTACAGCAAGTATCTGGTCTCGACACCACCAATCATGGTGTCCGGAGATGACAGCGTAAATGGGGAAA : 4897
J04 : ACGACAACACAGACTACAATCTCGGGTCATTTACAGCAAGTATCTGGTCTCGACACCACCAATCATGGTGTCCGGAGATGACAGCGTAAATGGGGAAA : 4897
J05 : ACGACAACACAGACTACAATCTCGGGTCATTTACAGCAAGTATCTGGTCTCGACACCACCAATCATGGTGTCCGGAGATGACAGCGTAAATGGGGAAA : 4897
JN : ACGACAACACAGACTACAATCTCGGGTCATTTACAGCAAGTATCTGGTCTCGACACCACCAATCATGGTGTCCGGAGATGACAGCGTAAATGGGGAAA : 4888

REP VI
J01 : CCCAAGCGTGTCTCGGAATGGCCAGCATCGAAAGCTGTCTTCGGTTTAAAACAGAAAAGCACCAAAACATCCOCTGTTCTCGGGATACTATGTA : 4997
J02 : CCCAAGCGTGTCTCGGAATGGCCAGCATCGAAAGCTGTCTTCGGTTTAAAACAGAAAAGCACCAAAACATCCOCTGTTCTCGGGATACTATGTA : 4997
J04 : CCCAAGCGTGTCTCGGAATGGCCAGCATCGAAAGCTGTCTTCGGTTTAAAACAGAAAAGCACCAAAACATCCOCTGTTCTCGGGATACTATGTA : 4997
J05 : CCCAAGCGTGTCTCGGAATGGCCAGCATCGAAAGCTGTCTTCGGTTTAAAACAGAAAAGCACCAAAACATCCOCTGTTCTCGGGATACTATGTA : 4997
JN : CCCAAGCGTGTCTCGGAATGGCCAGCATCGAAAGCTGTCTTCGGTTTAAAACAGAAAAGCACCAAAACATCCOCTGTTCTCGGGATACTATGTA : 4988

REP VII
J01 : GGACCAGCGGGGCCATCAGGCTCTCCAATCACCCCTTTTCGCAAAGATCATGAGTGCCTTGACGATCTCTCGATAGACGACAAATGGCAAGTTAATCTGT : 5097
J02 : GGACCAGCGGGGCCATCAGGCTCTCCAATCACCCCTTTTCGCAAAGATCATGAGTGCCTTGACGATCTCTCGATAGACGACAAATGGCAAGTTAATCTGT : 5097
J04 : GGACCAGCGGGGCCATCAGGCTCTCCAATCACCCCTTTTCGCAAAGATCATGAGTGCCTTGACGATCTCTCGATAGACGACAAATGGCAAGTTAATCTGT : 5097
J05 : GGACCAGCGGGGCCATCAGGCTCTCCAATCACCCCTTTTCGCAAAGATCATGAGTGCCTTGACGATCTCTCGATAGACGACAAATGGCAAGTTAATCTGT : 5097
JN : GGACCAGCGGGGCCATCAGGCTCTCCAATCACCCCTTTTCGCAAAGATCATGAGTGCCTTGACGATCTCTCGATAGACGACAAATGGCAAGTTAATCTGT : 5088

REP VIII
J01 : CTGAGTTCGGCATCGGGCACTCTCTCGGGCAGCACTTTTGGGATCTTCTGCAATTGATCAAGTCCCCTACCAATCCGGGCTGTAAGATTTCTCTGCCC : 5197
J02 : CTGAGTTCGGCATCGGGCACTCTCTCGGGCAGCACTTTTGGGATCTTCTGCAATTGATCAAGTCCCCTACCAATCCGGGCTGTAAGATTTCTCTGCCC : 5197
J04 : CTGAGTTCGGCATCGGGCACTCTCTCGGGCAGCACTTTTGGGATCTTCTGCAATTGATCAAGTCCCCTACCAATCCGGGCTGTAAGATTTCTCTGCCC : 5197
J05 : CTGAGTTCGGCATCGGGCACTCTCTCGGGCAGCACTTTTGGGATCTTCTGCAATTGATCAAGTCCCCTACCAATCCGGGCTGTAAGATTTCTCTGCCC : 5197
JN : CTGAGTTCGGCATCGGGCACTCTCTCGGGCAGCACTTTTGGGATCTTCTGCAATTGATCAAGTCCCCTACCAATCCGGGCTGTAAGATTTCTCTGCCC : 5188

J01 : GCATGCCTCGCGGAACAAGAAGCAGATCCCAACATCGGGAAGTGCCTGACACAGTTCTATCAAGATATAGCTAGTATCTCAGGTTGCCAGCCGAGCC : 5297
J02 : GCATGCCTCGCGGAACAAGAAGCAGATCCCAACATCGGGAAGTGCCTGACACAGTTCTATCAAGATATAGCTAGTATCTCAGGTTGCCAGCCGAGCC : 5297
J04 : GCATGCCTCGCGGAACAAGAAGCAGATCCCAACATCGGGAAGTGCCTGACACAGTTCTATCAAGATATAGCTAGTATCTCAGGTTGCCAGCCGAGCC : 5297
J05 : GCATGCCTCGCGGAACAAGAAGCAGATCCCAACATCGGGAAGTGCCTGACACAGTTCTATCAAGATATAGCTAGTATCTCAGGTTGCCAGCCGAGCC : 5297
JN : GCATGCCTCGCGGAACAAGAAGCAGATCCCAACATCGGGAAGTGCCTGACACAGTTCTATCAAGATATAGCTAGTATCTCAGGTTGCCAGCCGAGCC : 5288

J01 : CTGTATTGCTCTTGGCGTCTCAGTTGCGCGGGCTCTCACATCCAAGAAGACTGTACCCGATGCGTTTTGAAGATCCTGAGTTTCGCACATCCAGGGTG : 5397
J02 : CTGTATTGCTCTTGGCGTCTCAGTTGCGCGGGCTCTCACATCCAAGAAGACTGTACCCGATGCGTTTTGAAGATCCTGAGTTTCGCACATCCAGGGTG : 5397
J04 : CTGTATTGCTCTTGGCGTCTCAGTTGCGCGGGCTCTCACATCCAAGAAGACTGTACCCGATGCGTTTTGAAGATCCTGAGTTTCGCACATCCAGGGTG : 5397
J05 : CTGTATTGCTCTTGGCGTCTCAGTTGCGCGGGCTCTCACATCCAAGAAGACTGTACCCGATGCGTTTTGAAGATCCTGAGTTTCGCACATCCAGGGTG : 5397
JN : CTGTATTGCTCTTGGCGTCTCAGTTGCGCGGGCTCTCACATCCAAGAAGACTGTACCCGATGCGTTTTGAAGATCCTGAGTTTCGCACATCCAGGGTG : 5388

J01 : AATTGCTTCGAAGCTTCAAGAAATCTAACTAACCAAGTACGAGGGCGAGCATGTCAGACCAAGTCGTCAAACAGCTCGAATCCAACACAGCTCGACTC : 5497
J02 : AATTGCTTCGAAGCTTCAAGAAATCTAACTAACCAAGTACGAGGGCGAGCATGTCAGACCAAGTCGTCAAACAGCTCGAATCCAACACAGCTCGACTC : 5497
J04 : AATTGCTTCGAAGCTTCAAGAAATCTAACTAACCAAGTACGAGGGCGAGCATGTCAGACCAAGTCGTCAAACAGCTCGAATCCAACACAGCTCGACTC : 5497
J05 : AATTGCTTCGAAGCTTCAAGAAATCTAACTAACCAAGTACGAGGGCGAGCATGTCAGACCAAGTCGTCAAACAGCTCGAATCCAACACAGCTCGACTC : 5497
JN : AATTGCTTCGAAGCTTCAAGAAATCTAACTAACCAAGTACGAGGGCGAGCATGTCAGACCAAGTCGTCAAACAGCTCGAATCCAACACAGCTCGACTC : 5488

initiation box CP開始コード

```

図 2.6 続き

```

*      5520      *      5540      *      5560      *      5580      *      5600
J01 : CACTCCATCTCTCATCCCACGCCCCCTTCCAAGGGGGCAGTCGCACAGTGCCTTTCCAGACTGTGCAATGGACGTCGTCGCTGCCGGGGGCAATGCA : 5597
J02 : CACTCCATCTCTCATCCCACGCCCCCTTCCAAGGGGGCAGTCGCACAGTGCCTTTCCAGACTGTGCAATGGACGTCGTCGCTGCCGGGGGCAATGCA : 5597
J04 : CACTCCATCTCTCATCCCACGCCCCCTTCCAAGGGGGCAGTCGCACAGTGCCTTTCCAGACTGTGCAATGGACGTCGTCGCTGCCGGGGGCAATGCA : 5597
J05 : CACTCCATCTCTCATCCCACGCCCCCTTCCAAGGGGGCAGTCGCACAGTGCCTTTCCAGACTGTGCAATGGACGTCGTCGCTGCCGGGGGCAATGCA : 5597
JN  : CACTCCATCTCTCATCCCACGCCCCCTTCCAAGGGGGCAGTCGCACAGTGCCTTTCCAGACTGTGCAATGGACGTCGTCGCTGCCGGGGGCAATGCA : 5588

*      5620      *      5640      *      5660      *      5680      *      5700
J01 : ACTTTCAACTTAGCGGGCCACGTCCTCGCTTCTGAGATCACTGCACCGTACCAGGGGGCGCTGGGGGAACCAAAGCCATCGTCTGCCCCACCGCT : 5697
J02 : ACTTTCAACTTAGCGGGCCACGTCCTCGCTTCTGAGATCACTGCACCGTACCAGGGGGCGCTGGGGGAACCAAAGCCATCGTCTGCCCCACCGCT : 5697
J04 : ACTTTCAACTTAGCGGGCCACGTCCTCGCTTCTGAGATCACTGCACCGTACCAGGGGGCGCTGGGGGAACCAAAGCCATCGTCTGCCCCACCGCT : 5697
J05 : ACTTTCAACTTAGCGGGCCACGTCCTCGCTTCTGAGATCACTGCACCGTACCAGGGGGCGCTGGGGGAACCAAAGCCATCGTCTGCCCCACCGCT : 5697
JN  : ACTTTCAACTTAGCGGGCCACGTCCTCGCTTCTGAGATCACTGCACCGTACCAGGGGGCGCTGGGGGAACCAAAGCCATCGTCTGCCCCACCGCT : 5688

*      5720      *      5740      *      5760      *      5780      *      5800
J01 : CGTCCCTCCAATCCCAGATCACTCTTGACCTCGTCTGGAGCACCACAATGTCATATTCACCGACTCCAGATACTTCAGTCTACGGGGGACCCCGCTT : 5797
J02 : CGTCCCTCCAATCCCAGATCACTCTTGACCTCGTCTGGAGCACCACAATGTCATATTCACCGACTCCAGATACTTCAGTCTACGGGGGACCCCGCTT : 5797
J04 : CGTCCCTCCAATCCCAGATCACTCTTGACCTCGTCTGGAGCACCACAATGTCATATTCACCGACTCCAGATACTTCAGTCTACGGGGGACCCCGCTT : 5797
J05 : CGTCCCTCCAATCCCAGATCACTCTTGACCTCGTCTGGAGCACCACAATGTCATATTCACCGACTCCAGATACTTCAGTCTACGGGGGACCCCGCTT : 5797
JN  : CGTCCCTCCAATCCCAGATCACTCTTGACCTCGTCTGGAGCACCACAATGTCATATTCACCGACTCCAGATACTTCAGTCTACGGGGGACCCCGCTT : 5788

*      5820      *      5840      *      5860      *      5880      *      5900
J01 : TGCTATCGGGGGGCCCTCCTCAGCCACAGTATGAGTCCGGCTGACCTCAGCTACCTCAATCCTGTATCAAGGACTCCGTCATACGTGGACACT : 5897
J02 : TGCTATCGGGGGGCCCTCCTCAGCCACAGTATGAGTCCGGCTGACCTCAGCTACCTCAATCCTGTATCAAGGACTCCGTCATACGTGGACACT : 5897
J04 : TGCTATCGGGGGGCCCTCCTCAGCCACAGTATGAGTCCGGCTGACCTCAGCTACCTCAATCCTGTATCAAGGACTCCGTCATACGTGGACACT : 5897
J05 : TGCTATCGGGGGGCCCTCCTCAGCCACAGTATGAGTCCGGCTGACCTCAGCTACCTCAATCCTGTATCAAGGACTCCGTCATACGTGGACACT : 5897
JN  : TGCTATCGGGGGGCCCTCCTCAGCCACAGTATGAGTCCGGCTGACCTCAGCTACCTCAATCCTGTATCAAGGACTCCGTCATACGTGGACACT : 5888

*      5920      *      5940      *      5960      *      5980      *      6000
J01 : CCGAAGCTCACTCTCAACGCCCTCTGACCCAACTGGGTCTGGCTCAACCGCCACCACCGTCGCCACCGTGTGTGAGCGGCAAGCTGATCGCTCCGAGC : 5997
J02 : CCGAAGCTCACTCTCAACGCCCTCTGACCCAACTGGGTCTGGCTCAACCGCCACCACCGTCGCCACCGTGTGTGAGCGGCAAGCTGATCGCTCCGAGC : 5997
J04 : CCGAAGCTCACTCTCAACGCCCTCTGACCCAACTGGGTCTGGCTCAACCGCCACCACCGTCGCCACCGTGTGTGAGCGGCAAGCTGATCGCTCCGAGC : 5997
J05 : CCGAAGCTCACTCTCAACGCCCTCTGACCCAACTGGGTCTGGCTCAACCGCCACCACCGTCGCCACCGTGTGTGAGCGGCAAGCTGATCGCTCCGAGC : 5997
JN  : CCGAAGCTCACTCTCAACGCCCTCTGACCCAACTGGGTCTGGCTCAACCGCCACCACCGTCGCCACCGTGTGTGAGCGGCAAGCTGATCGCTCCGAGC : 5987

*      6020      *      6040      *      6060      *      6080      *      6100
J01 : CATTGGCCACACCCACACCCCTCGAGAGGTCCTTATTCAGCAATGTTTTGGGTAGTGGAGCCCTTAGCCTCCACCTTTTCCTTTCCTCTGGCAATAG : 6097
J02 : CATTGGCCACACCCACACCCCTCGAGAGGTCCTTATTCAGCAATGTTTTGGGTAGTGGAGCCCTTAGCCTCCACCTTTTCCTTTCCTCTGGCAATAG : 6097
J04 : CATTGGCCACACCCACACCCCTCGAGAGGTCCTTATTCAGCAATGTTTTGGGTAGTGGAGCCCTTAGCCTCCACCTTTTCCTTTCCTCTGGCAATAG : 6097
J05 : CATTGGCCACACCCACACCCCTCGAGAGGTCCTTATTCAGCAATGTTTTGGGTAGTGGAGCCCTTAGCCTCCACCTTTTCCTTTCCTCTGGCAATAG : 6097
JN  : CATTGGCCACACCCACACCCCTCGAGAGGTCCTTATTCAGCAATGTTTTGGGTAGTGGAGCCCTTAGCCTCCACCTTTTCCTTTCCTCTGGCAATAG : 6087

      终止コドン      终止コドン

J01 : CGCCTAAAT : 6106
J02 : CGCCTAAAT : 6106
J04 : CGCCTAAAT : 6106
J05 : CGCCTAAAT : 6106
JN  : CGCCTAAAT : 6095

```

図 2.6 続き





```

*          1020          *          1040          *          1060          *          1080          *          1100
J01 : KMPRGYVDLVAADPTVRFVILLGDPDLOGEYHSSHPESONKRLSSEIHRLLKYIDCYCLWSHRIPOCVARCFGEVSSNEHGVGFSSTIAPQDITLACS : 1100
J02 : KMPRGYVDLVAADPTVRFVILLGDPDLOGEYHSSHPESONKRLSSEIHRLLKYIDCYCLWSHRIPOCVARCFGEVSSNEHGVGFSSTIAPQDITLACS : 1100
J04 : KMPRGYVDLVAADPTVRFVILLGDPDLOGEYHSSHPESONKRLSSEIHRLLKYIDCYCLWSHRIPOCVARCFGEVSSNEHGVGFSSTIAPQDITLACS : 1100
J05 : KMPRGYVDLVAADPTVRFVILLGDPDLOGEYHSSHPESONKRLSSEIHRLLKYIDCYCLWSHRIPOCVARCFGEVSSNEHGVGFSSTIAPQDITLACS : 1100
JN  : KMPRGYVDLVAADPTVRFVILLGDPDLOGEYHSSHPESONKRLSSEIHRLLKYIDCYCLWSHRIPOCVARCFGEVSSNEHGVGFSSTIAPQDITLACS : 1096

          HEL III          HEL IV
*          1120          *          1140          *          1160          *          1180          *          1200
J01 : OSSAKTLRDAGYPATTVSSSQGSTYRTPINLLDRNSRRLSSAVSIVAATRSTMAINMTGDRDVLQOGPHNNPVFSALYNANLISLHSLFPTLFAKLPIT : 1200
J02 : OSSAKTLRDAGYPATTVSSSQGSTYRTPINLLDRNSRRLSSAVSIVAATRSTMAINMTGDRDVLQOGPHNNPVFSALYNANLISLHSLFPTLFAKLPIT : 1200
J04 : OSSAKTLRDAGYPATTVSSSQGSTYRTPINLLDRNSRRLSSAVSIVAATRSTMAINMTGDRDVLQOGPHNNPVFSALYNANLISLHSLFPTLFAKLPIT : 1200
J05 : OSSAKTLRDAGYPATTVSSSQGSTYRTPINLLDRNSRRLSSAVSIVAATRSTMAINMTGDRDVLQOGPHNNPVFSALYNANLISLHSLFPTLFAKLPIT : 1200
JN  : OSSAKTLRDAGYPATTVSSSQGSTYRTPINLLDRNSRRLSSAVSIVAATRSTMAINMTGDRDVLQOGPHNNPVFSALYNANLISLHSLFPTLFAKLPIT : 1196

          HEL V          HEL VI
*          1220          *          1240          *          1260          *          1280          *          1300
J01 : RTAITSRRGMLTGGNIFABDDVVIDSRPGPLNAPEVDDFLPTWRRPLHRNLASAVHNSCPAQSTVYTPATITAVYPGESFENLAHFLPAHDPEIKEI : 1300
J02 : RTAITSRRGMLTGGNIFABDDVVIDSRPGPLNAPEVDDFLPTWRRPLHRNLASAVHNSCPAQSTVYTPATITAVYPGESFENLAHFLPAHDPEIKEI : 1300
J04 : RTAITSRRGMLTGGNIFABDDVVIDSRPGPLNAPEVDDFLPTWRRPLHRNLASAVHNSCPAQSTVYTPATITAVYPGESFENLAHFLPAHDPEIKEI : 1300
J05 : RTAITSRRGMLTGGNIFABDDVVIDSRPGPLNAPEVDDFLPTWRRPLHRNLASAVHNSCPAQSTVYTPATITAVYPGESFENLAHFLPAHDPEIKEI : 1300
JN  : RTAITSRRGMLTGGNIFABDDVVIDSRPGPLNAPEVDDFLPTWRRPLHRNLASAVHNSCPAQSTVYTPATITAVYPGESFENLAHFLPAHDPEIKEI : 1296

*          1320          *          1340          *          1360          *          1380          *          1400
J01 : LHRGEFSAQFPILLNQDFFLSAQSSTLIAAKHDSKRDPTLLVASITKRLRFRPDSYQSSKQDQILGLTYHWCRAYNRHPQAVVPFDELLFAECINI : 1400
J02 : LHRGEFSAQFPILLNQDFFLSAQSSTLIAAKHDSKRDPTLLVASITKRLRFRPDSYQSSKQDQILGLTYHWCRAYNRHPQAVVPFDELLFAECINI : 1400
J04 : LHRGEFSAQFPILLNQDFFLSAQSSTLIAAKHDSKRDPTLLVASITKRLRFRPDSYQSSKQDQILGLTYHWCRAYNRHPQAVVPFDELLFAECINI : 1400
J05 : LHRGEFSAQFPILLNQDFFLSAQSSTLIAAKHDSKRDPTLLVASITKRLRFRPDSYQSSKQDQILGLTYHWCRAYNRHPQAVVPFDELLFAECINI : 1400
JN  : LHRGEFSAQFPILLNQDFFLSAQSSTLIAAKHDSKRDPTLLVASITKRLRFRPDSYQSSKQDQILGLTYHWCRAYNRHPQAVVPFDELLFAECINI : 1396

*          1420          *          1440          *          1460          *          1480          *          1500
J01 : NEFAQLSNKTKSTIIANASRSDPDWRITAVKIFSKTQHKINEASIFGSWKACQTLALMHDYVVLFLGPVKKYQRIQFDSQERPANVYHAGHSPLMSEWA : 1500
J02 : NEFAQLSNKTKSTIIANASRSDPDWRITAVKIFSKTQHKINEASIFGSWKACQTLALMHDYVVLFLGPVKKYQRIQFDSQERPANVYHAGHSPLMSEWA : 1500
J04 : NEFAQLSNKTKSTIIANASRSDPDWRITAVKIFSKTQHKINEASIFGSWKACQTLALMHDYVVLFLGPVKKYQRIQFDSQERPANVYHAGHSPLMSEWA : 1500
J05 : NEFAQLSNKTKSTIIANASRSDPDWRITAVKIFSKTQHKINEASIFGSWKACQTLALMHDYVVLFLGPVKKYQRIQFDSQERPANVYHAGHSPLMSEWA : 1500
JN  : NEFAQLSNKTKSTIIANASRSDPDWRITAVKIFSKTQHKINEASIFGSWKACQTLALMHDYVVLFLGPVKKYQRIQFDSQERPANVYHAGHSPLMSEWA : 1496

          REP I          REP II          REP III
*          1520          *          1540          *          1560          *          1580          *          1600
J01 : QKHLKSGISHNDYTAFDQSOHQGEAVVFEMAKMRRLSIPESLINLHSLYKRNVDTPQGPLTCMRLTGEPTDYDNTDYNLAVIYSKYLVLDHPIVMSGDD : 1600
J02 : QKHLKSGISHNDYTAFDQSOHQGEAVVFEMAKMRRLSIPESLINLHSLYKRNVDTPQGPLTCMRLTGEPTDYDNTDYNLAVIYSKYLVLDHPIVMSGDD : 1600
J04 : QKHLKSGISHNDYTAFDQSOHQGEAVVFEMAKMRRLSIPESLINLHSLYKRNVDTPQGPLTCMRLTGEPTDYDNTDYNLAVIYSKYLVLDHPIVMSGDD : 1600
J05 : QKHLKSGISHNDYTAFDQSOHQGEAVVFEMAKMRRLSIPESLINLHSLYKRNVDTPQGPLTCMRLTGEPTDYDNTDYNLAVIYSKYLVLDHPIVMSGDD : 1600
JN  : QKHLKSGISHNDYTAFDQSOHQGEAVVFEMAKMRRLSIPESLINLHSLYKRNVDTPQGPLTCMRLTGEPTDYDNTDYNLAVIYSKYLVLDHPIVMSGDD : 1596

          REP IV          REP V          REP VI
*          1620          *          1640          *          1660          *          1680          *          1700
J01 : SVIGGNPTVSRNWPAIEKLLALRFKTESTKHLFCGYVGPAGAIRSPITLFAKIMSAVDDLSIDDKLASYLSEFAIGHSLGHDFWDLPLIDQVPYQSAV : 1700
J02 : SVIGGNPTVSRNWPAIEKLLALRFKTESTKHLFCGYVGPAGAIRSPITLFAKIMSAVDDLSIDDKLASYLSEFAIGHSLGHDFWDLPLIDQVPYQSAV : 1700
J04 : SVIGGNPTVSRNWPAIEKLLALRFKTESTKHLFCGYVGPAGAIRSPITLFAKIMSAVDDLSIDDKLASYLSEFAIGHSLGHDFWDLPLIDQVPYQSAV : 1700
J05 : SVIGGNPTVSRNWPAIEKLLALRFKTESTKHLFCGYVGPAGAIRSPITLFAKIMSAVDDLSIDDKLASYLSEFAIGHSLGHDFWDLPLIDQVPYQSAV : 1700
JN  : SVIGGNPTVSRNWPAIEKLLALRFKTESTKHLFCGYVGPAGAIRSPITLFAKIMSAVDDLSIDDKLASYLSEFAIGHSLGHDFWDLPLIDQVPYQSAV : 1696

          REP VII          REP VIII
*          1720          *          1740          *          1760          *          1780          *          1800
J01 : YDFPCRHASREQKQILNIGEVPTVLSIASHLRFASRALYCLLPSSVRRALTSKKTVDFAFEDPDVSHMOGELLQNFQESNITKLRGAIMSDQVVKQLE : 1800
J02 : YDFPCRHASREQKQILNIGEVPTVLSIASHLRFASRALYCLLPSSVRRALTSKKTVDFAFEDPDVSHMOGELLQNFQESNITKLRGAIMSDQVVKQLE : 1800
J04 : YDFPCRHASREQKQILNIGEVPTVLSIASHLRFASRALYCLLPSSVRRALTSKKTVDFAFEDPDVSHMOGELLQNFQESNITKLRGAIMSDQVVKQLE : 1800
J05 : YDFPCRHASREQKQILNIGEVPTVLSIASHLRFASRALYCLLPSSVRRALTSKKTVDFAFEDPDVSHMOGELLQNFQESNITKLRGAIMSDQVVKQLE : 1800
JN  : YDFPCRHASREQKQILNIGEVPTVLSIASHLRFASRALYCLLPSSVRRALTSKKTVDFAFEDPDVSHMOGELLQNFQESNITKLRGAIMSDQVVKQLE : 1796

*          1820          *          1840          *          1860          *          1880          *          1900
J01 : SNHVDSTPSLIPRPPFOGGSRTVPFQTVAMDVVAAGGNATFNLAGHVSLSSEITAPYRKARLAEKAIVCPTAASFQSPITLIDLWVSTSNVIPTDLQILOV : 1900
J02 : SNHVDSTPSLIPRPPFOGGSRTVPFQTVAMDVVAAGGNATFNLAGHVSLSSEITAPYRKARLAEKAIVCPTAASFQSPITLIDLWVSTSNVIPTDLQILOV : 1900
J04 : SNHVDSTPSLIPRPPFOGGSRTVPFQTVAMDVVAAGGNATFNLAGHVSLSSEITAPYRKARLAEKAIVCPTAASFQSPITLIDLWVSTSNVIPTDLQILOV : 1900
J05 : SNHVDSTPSLIPRPPFOGGSRTVPFQTVAMDVVAAGGNATFNLAGHVSLSSEITAPYRKARLAEKAIVCPTAASFQSPITLIDLWVSTSNVIPTDLQILOV : 1900
JN  : SNHVDSTPSLIPRPPFOGGSRTVPFQTVAMDVVAAGGNATFNLAGHVSLSSEITAPYRKARLAEKAIVCPTAASFQSPITLIDLWVSTSNVIPTDLQILOV : 1896

*          1920          *          1940          *          1960          *          1980          *
J01 : YGGTRFAIGGPLLSHTYELRADLSYLNPKDSVSYVDTPKLTNLSADPTGSGSTATTVATVIVSGKLIIVSDALATPTPLF----- : 1981
J02 : YGGTRFAIGGPLLSHTYELRADLSYLNPKDSVSYVDTPKLTNLSADPTGSGSTATTVATVIVSGKLIIVSDALATPTPLF----- : 1981
J04 : YGGTRFAIGGPLLSHTYELRADLSYLNPKDSVSYVDTPKLTNLSADPTGSGSTATTVATVIVSGKLIIVSDALATPTPLF----- : 1981
J05 : YGGTRFAIGGPLLSHTYELRADLSYLNPKDSVSYVDTPKLTNLSADPTGSGSTATTVATVIVSGKLIIVSDALATPTPLF----- : 1981
JN  : YGGTRFAIGGPLLSHTYELRADLSYLNPKDSVSYVDTPKLTNLSADPTGSGSTATTVATVIVSGKLIIVSDALATPTPLF----- : 1986

```

図 2.7 続き

### 3.3 遺伝子発現様式

#### 3.3.1 Cleavage site の解析

PnMV は *Tymovirus* 科の未帰属種とされているものの、その遺伝子発現は同科のウイルス属と類似した様式をとると予測されている (Bradel et al., 2000; Maccheroni et al., 2005)。そこで PnMV-JO, -JN における遺伝子発現様式について、近縁のウイルスおよび既報の PnMV 分離株との比較解析を行った。

*Tymovirus* 属の TYMV では PRO の持つプロテアーゼ活性により、RdRp が PRO-HEL 間および HEL-REP 間の特定の部位 (それぞれ Ser/Gln および Ala/Thr) で切断されることが報告されている (Bransom et al., 1991; Jakubiec et al., 2007)。これらの切断には、切断部位より上流の 7 アミノ酸 から下流の 2 アミノ酸にかけてのアミノ酸配列が重要であることが報告されている (Bransom et al., 1991; Bransom et al., 1996)。PnMV の RdRp が TYMV と同様に自己切断をするか調べるため、TYMV および他の *Tymovirus* 属ウイルスの RdRp と PnMV-JO, -JN, -G および -Nor の RdRp 領域のアミノ酸配列を用いてアライメントを作成し、TYMV の切断サイト周辺の配列について比較解析を行った。但し、4 つの JO 株間では配列の相同性が非常に高かったため、ここでは JO1 の配列のみを用いた。その結果、PnMV 全分離株に *Tymovirus* 属ウイルスの自己切断に重要な数アミノ酸が保存されていた (図 2.8 (a), (b))。したがって、PnMV の RdRp は TYMV の RdRp と同様、PRO-HEL 間および HEL-REP 間で自己切断する可能性が考えられた。さらには、後述するように (第 2 章 3.6 項)、JO 分離株間の比較において見出された、病徴型と相関する 1218 番目のアミノ酸は、PnMV の PRO-HEL 間の推定切断サイトより 2 アミノ酸下流に位置していた (図 2.8 (b))。



(a)

<i>Tymovirus</i> 属	PnMV-JO1 (832-843)	LVADGT	RAL
	PnMV-JN (829-840)	LVADGT	RAL
	PnMV-G (829-840)	LVADGT	RAL
	PnMV-Nor (829-840)	LVADGT	RAL
	TYMV (874-885)	KRL LGS	QPS
	ScrMV (815-826)	IKLTAS	APG
	AVYV (800-811)	IKLIGS	APG
	OYMV (802-813)	IKLAAA	APG
	PIMoV (814-825)	VKLSAS	APG
	EMV (867-878)	PRLAAS	APR
	PhyMV (862-973)	PRL LGS	APH
	ChMV (859-870)	ARLNGS	APR
	DuMV (772-783)	RRIVGG	APK
	KYMV (901-911)	PKIIGS	N-S
	ErLV (771-782)	DPLRAG	SPP



(b)

<i>Tymovirus</i> 属	PnMV-JO1 (1209-1217)	GMLTGG	NTS
	PnMV-JN (1205-1213)	GMLTGG	NTF
	PnMV-G (1206-1214)	GMLTGG	NTS
	PnMV-Nor (1206-1214)	GMLTGG	NTS
	TYMV (1254-1262)	PKLNGA	TPS
	ScrMV (1189-1197)	HRLVAG	DRL
	AVYV (1174-1182)	HRLVAG	NTV
	OYMV (1176-1184)	HRLVAG	HTP
	PIMoV (1188-1196)	HRLVAG	DQS
	EMV (1242-1250)	NRFVSG	SLN
	PhyMV (1340-1348)	TRLVAG	LTN
	ChMV (1236-1244)	TRLLGG	FSL
	DuMV (1152-1160)	VRLTGG	DIS
	KYMV (1284-1292)	TRLIGS	HSP
	ErLV (1152-1160)	SSFRSG	FQP



図 2.8 PnMV と *Tymovirus* 属ウイルスの RdRp の切断部位周辺のアミノ酸の比較

(a) は PRO-HEL ドメイン間領域、(b) は HEL-REP ドメイン間領域。橙色で示した部分は、PnMV-JO で病徴型と相関性のあるアミノ酸。▲は TYMV で報告されている切断部位を示す。



*Marafivirus* 属では一つの ORF から翻訳されたポリタンパク質が、RdRp-CP の境界領域において PRO の活性により切断され、切断産物としてそれぞれ単独の RdRp と CP が生じることが報告されている (Edwards et al., 1997)。この切断サイト周辺のアミノ酸配列は、切断部位前後の 7 アミノ酸ずつが *Marafivirus* 属内で高度に保存されており、特に切断部位から上流へ 2 番目の Gly は、全ての *Marafivirus* 属ウイルスで保存されている (Maccheroni et al., 2005)。PnMV は一つの ORF に RdRp と CP を連続してコードしており、そのゲノム構造は *Marafivirus* 属ウイルスのものと類似しているため、PnMV の RdRp と CP もポリタンパク質として翻訳されたのちに切断されて発現している可能性が考えられた。そこで、PnMV-JO1, -JN, -G および -Nor のポリタンパク質のアミノ酸配列を数種の *Marafivirus* 属ウイルスとアラインメントしたのち、*Marafivirus* 属ウイルスで見出される切断サイト付近におけるアミノ酸配列を比較したところ (図 2.9)、*Marafivirus* 属ウイルス間で保存性の高いアミノ酸配列は、PnMV においても保存性が見られた。このことから、PnMV はポリタンパク質の切断により CP を発現している可能性が考えられた。

<i>Marafivirus</i> 属	PnMV-JO1 (1783-1796)	I T K L R G A	D M S D Q V V
	PnMV-JN (1779-1792)	L T K L R G A	D M S D Q V V
	PnMV-G (1780-1793)	L T K L R G A	D M S D Q V V
	PnMV-Nor (1780-1793)	P T K L R G A	D M S D Q V V
	OBDV (1828-1841)	S L P L F G G	L S P D N I L
	MRFV (1783-1796)	H L P L R G G	H M P N P L A
	CSDaV (1967-1980)	L L P L T G G	S S A P I L T
	GAMaV (335-348)	L L P L K G G	S S A P Q L T

▲

図 2.9 PnMV と *Marafivirus* 属ウイルスのポリタンパク質の RdRp-CP 切断部位周辺のアミノ酸配列の比較

▲は OBDV で報告されている切断部位を表す。

### 3.3.2 tymobox についての解析

*Tymovirus* 属と *Marafivirus* 属においては、CP の開始コドンの 60 塩基上流にサブゲノム



### 3.4 PnMV の遺伝的多様性の解析

#### 3.4.1 RdRp 配列の比較解析

前項で JO と JN の分離株間の比較で塩基の挿入/欠失が見られたため、既報の PnMV-G, -Nor の配列も含めて比較し、PnMV の遺伝的多様性について解析を行った。但し、4 つの JO 分離株間は配列の相同性が高かったため、ここでも JO1 の配列のみを解析に用いた。

まず RdRp の配列について比較解析を行った。その結果、塩基配列の相同性はいずれの分離株間でも 96%以上の高い値を示した。一方、アミノ酸配列の相同性は、PnMV-JN, -G, -Nor 間の比較では 97.5–98.4%の高い値をとったが、PnMV-JO1 と PnMV-JN, -G, -Nor の比較では 90.6–91.2%と、塩基配列の場合と比較して低かった (表 2.3 (b))。一般に、遺伝子に生じる変異の大半は塩基置換である。1 つのコドンに対応するアミノ酸は数種類あり、塩基置換を生じても対応するアミノ酸が変わらない場合が存在する (Crick, 1966)。そのため、原理的に塩基配列レベルよりアミノ酸配列レベルの相同性のほうが高くなると考えられる。

PnMV-JO1 と PnMV-JN, -G, -Nor のアミノ酸配列の相同性が、塩基配列の相同性よりも低かった原因は JO と JN 分離株間で見出されたフレームシフトにあると考え、RdRp の塩基配列およびアミノ酸配列のアライメントを詳細に調べた。その結果、PnMV-JO1 では JN に加えて他の 2 分離株と比較した際にも、塩基配列の 1,648–2,205 番目の約 560 塩基の領域に計 9 塩基が分散した挿入が見出された (図 2.11)。その結果、8 回のフレームシフトが生じ、RdRp の 523–636 番目および 672–708 番目の計 151 アミノ酸の領域 (MTR と PRO のドメイン領域に相当する) のアミノ酸配列は、JO 分離株と他の分離株間で大きく異なっていた (図 2.12)。しかしながら、フレームシフトが生じていたにもかかわらず、終止コドンは現れておらず、9 塩基目の挿入によって再び読み枠が他の分離株と同じものに回復していた。

(a)

	JO1	JN	G	Nor
JO1		97.7	96.9	96.6
JN	91.5		97.8	97.6
G	91.3	98.1		96.6
Nor	91.4	98.0	97.3	

(b)

	JO1	JN	G	Nor
JO1		97.6	97.0	96.5
JN	91.2		97.9	97.6
G	90.9	98.0		96.8
Nor	90.6	98.4	97.5	

(c)

	JO1	JN	G	Nor
JO1		98.6	98.1	97.7
JN	94.7		98.0	97.4
G	94.7	99.0		96.9
Nor	99.0	94.7	94.7	

表 2.3 PnMV-JO1, -JN, -G, -Nor 分離株間の配列の相同性

(a) 斜線の上側は全塩基配列、ポリタンパク質の全アミノ酸配列の相同性を示す。(b) RdRp の相同性。斜線の上側は塩基配列、下側はアミノ酸配列の相同性を表す。比較的低い相同性を桃色で示した。(c) CP の相同性。斜線の上側は塩基配列、下側はアミノ酸配列の相同性を表す。比較的低い相同性を桃色で示した。





```

*      *      *      *      *      *      *      *
JO1 : ACTGCCTCTAACCGCTCTTCCAACCTCTATTCTCTGGAATGGCAGCCTCTGGCAGCGCTTCATCTCTCGCCTGCAAAACAGTGGTCGCAGAGTGAATCTTT : 1197
JN  : ACTGCCTCTAACCGCTCTTCCAACCTCTATTCTCTGGAATGGCAGCCTCTGGCAGCGCTTCATCTCTCGCCTGCAAAACAGTGGTCGCAGAGTGAATCTTT : 1200
G   : ACTGCCTCTAACCGCTCTTCCAACCTCTATTCTCTGGAATGGCAGCCTCTGGCAGCGCTTCATCTCTCGCCTGCAAAACAGTGGTCGCAGAGTGAATCTTT : 1200
Nor : ACTGCCTCTAACCGCTCTTCCAACCTCTATTCTCTGGAATGGCAGCCTCTGGCAGCGCTTCATCTCTCGCCTGCAAAACAGTGGTCGCAGAGTGAATCTTT : 1198

*      *      *      *      *      *      *      *
JO1 : CAGCCATCTTCACTTCTCTCCATCACCACCTTCTCTCTCTCTCTCTCTTCCAGTACTTCCGTCGAAATCTGCTACTCTCAGGCTTTGCCAGGACCT : 1297
JN  : CAGCCATCTTCACTTCTCTCCATCACCACCTTCTCTCTCTCTCTCTTCCAGTACTTCCGTCGAAATCTGCTACTCTCAGGCTTTGCCAGGACCT : 1300
G   : CAGCCATCTTCACTTCTCTCCATCACCACCTTCTCTCTCTCTCTTCCAGTACTTCCGTCGAAATCTGCTACTCTCAGGCTTTGCCAGGACCT : 1300
Nor : CAGCCATCTTCACTTCTCTCCATCACCACCTTCTCTCTCTCTCTTCCAGTACTTCCGTCGAAATCTGCTACTCTCAGGCTTTGCCAGGACCT : 1298

*      *      *      *      *      *      *      *
JO1 : CGGTTTCCGGACTTTGGACGAGCACATCAAGCTCCATGAAGCTCTCTCCAGGCTGGTTTAGTTATACACACACTTCCCAAACCCGCCAAGGGCTCGA : 1397
JN  : CGGTTTCCGGACTTTGGACGAGCACATCAAGCTCCATGAAGCTCTCTCCAGGCTGGTTTAGTTATACACACACTTCCCAAACCCGCCAAGGGCTCGA : 1400
G   : CGGTTTCCGGACTTTGGACGAGCACATCAAGCTCCATGAAGCTCTCTCCAGGCTGGTTTAGTTATACACACACTTCCCAAACCCGCCAAGGGCTCGA : 1400
Nor : CGGTTTCCGGACTTTGGACGAGCACATCAAGCTCCATGAAGCTCTCTCCAGGCTGGTTTAGTTATACACACACTTCCCAAACCCGCCAAGGGCTCGA : 1398

*      *      *      *      *      *      *      *
JO1 : GATTTCTACCAAGGGCCGCTGAGCGATTCAAATTCATGTCCGCCCTCTGCTGCTCCATCTCCCTCTCTCCCTGCTTGCCTCGCCATTTATTTCCA : 1497
JN  : GATTTCTACCAAGGGCCGCTGAGCGATTCAAATTCATGTCCGCCCTCTGCTGCTCCATCTCCCTCTCTCCCTGCTTGCCTCGCCATTTATTTCCA : 1500
G   : GATTTCTACCAAGGGCCGCTGAGCGATTCAAATTCATGTCCGCCCTCTGCTGCTCCATCTCCCTCTCTCCCTGCTTGCCTCGCCATTTATTTCCA : 1500
Nor : GATTTCTACCAAGGGCCGCTGAGCGATTCAAATTCATGTCCGCCCTCTGCTGCTCCATCTCCCTCTCTCCCTGCTTGCCTCGCCATTTATTTCCA : 1498

*      *      *      *      *      *      *      *
JO1 : AGTGCACGACGCCATGCCCTCAGAGCCTTACAGATTCCTACCACAAATACCATCATCCAAGCAATGGGTCTTGGATGGAGTCCGCGGCTCACCGT : 1597
JN  : AGTGCACGACGCCATGCCCTCAGAGCCTTACAGATTCCTACCACAAATACCATCATCCAAGCAATGGGTCTTGGATGGAGTCCGCGGCTCACCGT : 1600
G   : AGTGCACGACGCCATGCCCTCAGAGCCTTACAGATTCCTACCACAAATACCATCATCCAAGCAATGGGTCTTGGATGGAGTCCGCGGCTCACCGT : 1600
Nor : AGTGCACGACGCCATGCCCTCAGAGCCTTACAGATTCCTACCACAAATACCATCATCCAAGCAATGGGTCTTGGATGGAGTCCGCGGCTCACCGT : 1598

*      *      *      *      *      *      *      *
JO1 : GGTCACTCCCGAGGCTTCTCTGCTTTCGAACCTGTTCCAATCCCTGCGGATCCAATGGCGCCACATGGACCCCGGCCCCCTCCAGAGGCTGTGTGAT : 1697
JN  : GGTCACTCCCGAGGCTTCTCTGCTTTCGAACCTGTTCCAATCCCTGCGGATCCAATGGCGCCACATGGACCCCGGCCCCCTCCAGAGGCTGTGTGAT : 1699
G   : GGTCACTCCCGAGGCTTCTCTGCTTTCGAACCTGTTCCAATCCCTGCGGATCCAATGGCGCCACATGGACCCCGGCCCCCTCCAGAGGCTGTGTGAT : 1699
Nor : GGTCACTCCCGAGGCTTCTCTGCTTTCGAACCTGTTCCAATCCCTGCGGATCCAATGGCGCCACATGGACCCCGGCCCCCTCCAGAGGCTGTGTGAT : 1697

*      *      *      *      *      *      *      *
JO1 : CTCGCTCAGATGAGAACTCCTTTGGTGCCGGCAGCACGGCTCGTTTACGGGCAATCGACATCACCATAACAATTAAGGCTCCGGATTTTCCCTGTCG : 1797
JN  : CTCGCTCAGATGAGAACTCCTTTGGTGCCGGCAGCACGGCTCGTTTACGGGCAATCGACATCACCATAACAATTAAGGCTCCGGATTTTCCCTGTCG : 1799
G   : CTCGCTCAGATGAGAACTCCTTTGGTGCCGGCAGCACGGCTCGTTTACGGGCAATCGACATCACCATAACAATTAAGGCTCCGGATTTTCCCTGTCG : 1799
Nor : CTCGCTCAGATGAGAACTCCTTTGGTGCCGGCAGCACGGCTCGTTTACGGGCAATCGACATCACCATAACAATTAAGGCTCCGGATTTTCCCTGTCG : 1797

*      *      *      *      *      *      *      *
JO1 : ACACCTACACCGCTGAAGGGATGTCATTTATCTGCACCGATTACTTGCCTGATTTACAGTGAACACAGAGACCCCTGGCCAACACCAAGCCGCTCATCTCTGA : 1897
JN  : ACACCTACACCGCTGAAGGGATGTCATTTATCTGCACCGATTACTTGCCTGATTTACAGTGAACACAGAGACCCCTGGCCAACACCAAGCCGCTCATCTCTGA : 1899
G   : ACACCTACACCGCTGAAGGGATGTCATTTATCTGCACCGATTACTTGCCTGATTTACAGTGAACACAGAGACCCCTGGCCAACACCAAGCCGCTCATCTCTGA : 1899
Nor : ACACCTACACCGCTGAAGGGATGTCATTTATCTGCACCGATTACTTGCCTGATTTACAGTGAACACAGAGACCCCTGGCCAACACCAAGCCGCTCATCTCTGA : 1897

*      *      *      *      *      *      *      *
JO1 : TGACCAAGAGGCGCAGGCGGAGCCGCAATCTTGGCCCTCTCGCGCCCTCTCAGAACCCAAGGCTGCGCTGCTCAGCCCGGGAGCCCTTGAAGGCTC : 1997
JN  : TGACCAAGAGGCGCAGGCGGAGCCGCAATCTTGGCCCTCTCGCGCCCTCTCAGAACCCAAGGCTGCGCTGCTCAGCCCGGGAGCCCTTGAAGGCTC : 1997
G   : TGACCAAGAGGCGCAGGCGGAGCCGCAATCTTGGCCCTCTCGCGCCCTCTCAGAACCCAAGGCTGCGCTGCTCAGCCCGGGAGCCCTTGAAGGCTC : 1997
Nor : TGACCAAGAGGCGCAGGCGGAGCCGCAATCTTGGCCCTCTCGCGCCCTCTCAGAACCCAAGGCTGCGCTGCTCAGCCCGGGAGCCCTTGAAGGCTC : 1995

*      *      *      *      *      *      *      *
JO1 : CTTACGCCCGCCACCGCCAAAGAGGCCGATCCAGCACCCCAAAAACCGCAGTATTAACACCTACTCTGATGGGGCCGACAAGTGTACCCGCTGCG : 2097
JN  : CTTACGCCCGCCACCGCCAAAGAGGCCGATCCAGCACCCCAAAAACCGCAGTATTAACACCTACTCTGATGGGGCCGACAAGTGTACCCGCTGCG : 2096
G   : CTTACGCCCGCCACCGCCAAAGAGGCCGATCCAGCACCCCAAAAACCGCAGTATTAACACCTACTCTGATGGGGCCGACAAGTGTACCCGCTGCG : 2096
Nor : CTTACGCCCGCCACCGCCAAAGAGGCCGATCCAGCACCCCAAAAACCGCAGTATTAACACCTACTCTGATGGGGCCGACAAGTGTACCCGCTGCG : 2094

*      *      *      *      *      *      *      *
JO1 : ATGAGCATGGTGACCTCTCCCAATCTCCACGAGGAGCTGTCTCGGAAATCAGCCAGCTATGGTCTGATCCACCGCTTACGGGCGGTTCAGAGCTTT : 2197
JN  : ATGAGCATGGTGACCTCTCCCAATCTCCACGAGGAGCTGTCTCGGAAATCAGCCAGCTATGGTCTGATCCACCGCTTACGGGCGGTTCAGAGCTTT : 2192
G   : ATGAGCATGGTGACCTCTCCCAATCTCCACGAGGAGCTGTCTCGGAAATCAGCCAGCTATGGTCTGATCCACCGCTTACGGGCGGTTCAGAGCTTT : 2192
Nor : ATGAGCATGGTGACCTCTCCCAATCTCCACGAGGAGCTGTCTCGGAAATCAGCCAGCTATGGTCTGATCCACCGCTTACGGGCGGTTCAGAGCTTT : 2190

*      *      *      *      *      *      *      *
JO1 : CGCACAACTCTACCCCGGCAACTATATAGGAACCTCCGCTGACTTCTCTCTCGCCTCCGCAACGGCCCGCCCAAGCCGTGTCCCAATCCAGTGAACCAG : 2297
JN  : CGCACAACTCTACCCCGGCAACTATATAGGAACCTCCGCTGACTTCTCTCTCGCCTCCGCAACGGCCCGCCCAAGCCGTGTCCCAATCCAGTGAACCAG : 2291
G   : CGCACAACTCTACCCCGGCAACTATATAGGAACCTCCGCTGACTTCTCTCTCGCCTCCGCAACGGCCCGCCCAAGCCGTGTCCCAATCCAGTGAACCAG : 2291
Nor : CGCACAACTCTACCCCGGCAACTATATAGGAACCTCCGCTGACTTCTCTCTCGCCTCCGCAACGGCCCGCCCAAGCCGTGTCCCAATCCAGTGAACCAG : 2289

```

図 2.11 続き

```

*      2320      *      2340      *      2360      *      2380      *      2400
JO1 : AGTGCCTCTTAGTGGCAATCAGAAAGCCACCTCCATCTCGCTCGAAGAGTTTGGGAAGACCCTCGCTGCCTCTGCCCATTCTCTCTGTTGCCCTG : 2397
JN  : AGTGCCTCTTAGTGGCAATCAGAAAGCCACCTCCATCTCGCTCGAAGAGTTTGGGAAGACCCTCGCTGCCTCTGCCCATTCTCTCTGTTGCCCTG : 2391
G   : AGTGCCTCTTAGTGGCAATCAGAAAGCCACCTCCATCTCGCTCGAAGAGTTTGGGAAGACCCTCGCTGCCTCTGCCCATTCTCTCTGTTGCCCTG : 2391
Nor : AGTGCCTCTTAGTGGCAATCAGAAAGCCACCTCCATCTCGCTCGAAGAGTTTGGGAAGACCCTCGCTGCCTCTGCCCATTCTCTCTGTTGCCCTG : 2389
      Cys

*      2420      *      2440      *      2460      *      2480      *      2500
JO1 : AGGACATAACGACCCGGCCCTCCACGGACCCTTCGTAGTCTTAGCTCCGCCCACTCTTTGAAGTGCATTTTCATCTCTGGGGCGCTCGAGCTCGA : 2497
JN  : AGGACATAACGACCCGGCCCTCCACGGACCCTTCGTAGTCTTAGCTCCGCCCACTCTTTGAAGTGCATTTTCATCTCTGGGGCGCTCGAGCTCGA : 2491
G   : AGGACATAACGACCCGGCCCTCCACGGACCCTTCGTAGTCTTAGCTCCGCCCACTCTTTGAAGTGCATTTTCATCTCTGGGGCGCTCGAGCTCGA : 2491
Nor : AGGACATAACGACCCGGCCCTCCACGGACCCTTCGTAGTCTTAGCTCCGCCCACTCTTTGAAGTGCATTTTCATCTCTGGGGCGCTCGAGCTCGA : 2489

*      2520      *      2540      *      2560      *      2580      *      2600
JO1 : GTTAGGCCTCCACAACGCCACACCCTCTTCACAATCAAGCAACAAGTCTGGTAATCAACTGCCACATCGAGCTCGTCGGCGATGGGACCCGGGCC : 2597
JN  : GTTAGGCCTCCACAACGCCACACCCTCTTCACAATCAAGCAACAAGTCTGGTAATCAACTGCCACATCGAGCTCGTCGGCGATGGGACCCGGGCC : 2591
G   : GTTAGGCCTCCACAACGCCACACCCTCTTCACAATCAAGCAACAAGTCTGGTAATCAACTGCCACATCGAGCTCGTCGGCGATGGGACCCGGGCC : 2591
Nor : GTTAGGCCTCCACAACGCCACACCCTCTTCACAATCAAGCAACAAGTCTGGTAATCAACTGCCACATCGAGCTCGTCGGCGATGGGACCCGGGCC : 2589
      His

*      2620      *      2640      *      2660      *      2680      *      2700
JO1 : CTTTCAGGGCGCCGACGCGATACGAAGGAAATGAACCGGGCGCCCTGGGTTTCAAATTCGAAGACCGCTTCTCCCGTTTCGCAAAGTCCATGTCTACA : 2697
JN  : CTTTCAGGGCGCCGACGCGATACGAAGGAAATGAACCGGGCGCCCTGGGTTTCAAATTCGAAGACCGCTTCTCCCGTTTCGCAAAGTCCATGTCTACA : 2688
G   : CTTTCAGGGCGCCGACGCGATACGAAGGAAATGAACCGGGCGCCCTGGGTTTCAAATTCGAAGACCGCTTCTCCCGTTTCGCAAAGTCCATGTCTACA : 2691
Nor : CTTTCAGGGCGCCGACGCGATACGAAGGAAATGAACCGGGCGCCCTGGGTTTCAAATTCGAAGACCGCTTCTCCCGTTTCGCAAAGTCCATGTCTACA : 2689

*      2720      *      2740      *      2760      *      2780      *      2800
JO1 : CCACGGAACCCGACCGCCCAAGAAATCATCTCAACATGAAGAATGGCTTCGATGGTCTCTCGCAACATGACCCGAACCCCGCATGAAGCCCG : 2797
JN  : CCACGGAACCCGACCGCCCAAGAAATCATCTCAACATGAAGAATGGCTTCGATGGTCTCTCGCAACATGACCCGAACCCCGCATGAAGCCCG : 2788
G   : CCACGGAACCCGACCGCCCAAGAAATCATCTCAACATGAAGAATGGCTTCGATGGTCTCTCGCAACATGACCCGAACCCCGCATGAAGCCCG : 2791
Nor : CCACGGAACCCGACCGCCCAAGAAATCATCTCAACATGAAGAATGGCTTCGATGGTCTCTCGCAACATGACCCGAACCCCGCATGAAGCCCG : 2789

*      2820      *      2840      *      2860      *      2880      *      2900
JO1 : TCACCGCTCCTTGCCTTCAGCGGAGTATTGAAGTGCACGCCCCAGAAAAGTAAAGTCTGATTACCTAGCCGGGTTCCAGGCTGCGGAAAGACCAAG : 2897
JN  : TCACCGCTCCTTGCCTTCAGCGGAGTATTGAAGTGCACGCCCCAGAAAAGTAAAGTCTGATTACCTAGCCGGGTTCCAGGCTGCGGAAAGACCAAG : 2888
G   : TCACCGCTCCTTGCCTTCAGCGGAGTATTGAAGTGCACGCCCCAGAAAAGTAAAGTCTGATTACCTAGCCGGGTTCCAGGCTGCGGAAAGACCAAG : 2891
Nor : TCACCGCTCCTTGCCTTCAGCGGAGTATTGAAGTGCACGCCCCAGAAAAGTAAAGTCTGATTACCTAGCCGGGTTCCAGGCTGCGGAAAGACCAAG : 2889

      HEL I
*      2920      *      2940      *      2960      *      2980      *      3000
JO1 : CCCATCCAGGCCCTCCTCAAGACAGCCTTTTTCGGGATTAACAAGTGGCAGTGCACCCGTTGGAGTTTCGGCGCGAGTGGAAAGCTGATCTGGCGCTTA : 2997
JN  : CCCATCCAGGCCCTCCTCAAGACAGCCTTTTTCGGGATTAACAAGTGGCAGTGCACCCGTTGGAGTTTCGGCGCGAGTGGAAAGCTGATCTGGCGCTTA : 2988
G   : CCCATCCAGGCCCTCCTCAAGACAGCCTTTTTCGGGATTAACAAGTGGCAGTGCACCCGTTGGAGTTTCGGCGCGAGTGGAAAGCTGATCTGGCGCTTA : 2991
Nor : CCCATCCAGGCCCTCCTCAAGACAGCCTTTTTCGGGATTAACAAGTGGCAGTGCACCCGTTGGAGTTTCGGCGCGAGTGGAAAGCTGATCTGGCGCTTA : 2989

      HEL I a
*      3020      *      3040      *      3060      *      3080      *      3100
JO1 : AAACCGGCCAGGCTTGGAGACTCTCCACTTGGGAGTCTCCTTGCCTCAAGACCGCCCTCATTCTTGTATTGATGAGGTGTACAAAATGCCCCGCGGTTA : 3097
JN  : AAACCGGCCAGGCTTGGAGACTCTCCACTTGGGAGTCTCCTTGCCTCAAGACCGCCCTCATTCTTGTATTGATGAGGTGTACAAAATGCCCCGCGGTTA : 3088
G   : AAACCGGCCAGGCTTGGAGACTCTCCACTTGGGAGTCTCCTTGCCTCAAGACCGCCCTCATTCTTGTATTGATGAGGTGTACAAAATGCCCCGCGGTTA : 3091
Nor : AAACCGGCCAGGCTTGGAGACTCTCCACTTGGGAGTCTCCTTGCCTCAAGACCGCCCTCATTCTTGTATTGATGAGGTGTACAAAATGCCCCGCGGTTA : 3089

      HEL II
*      3120      *      3140      *      3160      *      3180      *      3200
JO1 : TGTGGATTGGCGGTTCAGAGCTGATCCACCCGCTTTTGTGATCTTTTGGGTGACCCCTTCAAGGCGAGTATCACAGCTCCCATCCGGAATCCAG : 3197
JN  : TGTGGATTGGCGGTTCAGAGCTGATCCACCCGCTTTTGTGATCTTTTGGGTGACCCCTTCAAGGCGAGTATCACAGCTCCCATCCGGAATCCAG : 3188
G   : TGTGGATTGGCGGTTCAGAGCTGATCCACCCGCTTTTGTGATCTTTTGGGTGACCCCTTCAAGGCGAGTATCACAGCTCCCATCCGGAATCCAG : 3191
Nor : TGTGGATTGGCGGTTCAGAGCTGATCCACCCGCTTTTGTGATCTTTTGGGTGACCCCTTCAAGGCGAGTATCACAGCTCCCATCCGGAATCCAG : 3189

      HEL III
*      3220      *      3240      *      3260      *      3280      *      3300
JO1 : AA1AAGCGACTCTCTCGGAGTCCACAGGCTGCTCAAGTACATCGACTGTATTGCTTGGTCTCACCGAATCCTCAATGCGTCCGCCGCTGTTTCG : 3297
JN  : AA1AAGCGACTCTCTCGGAGTCCACAGGCTGCTCAAGTACATCGACTGTATTGCTTGGTCTCACCGAATCCTCAATGCGTCCGCCGCTGTTTCG : 3288
G   : AA1AAGCGACTCTCTCGGAGTCCACAGGCTGCTCAAGTACATCGACTGTATTGCTTGGTCTCACCGAATCCTCAATGCGTCCGCCGCTGTTTCG : 3291
Nor : AA1AAGCGACTCTCTCGGAGTCCACAGGCTGCTCAAGTACATCGACTGTATTGCTTGGTCTCACCGAATCCTCAATGCGTCCGCCGCTGTTTCG : 3289

      HEL IV
*      3320      *      3340      *      3360      *      3380      *      3400
JO1 : GGGTTGAGAGCTCAAACGAGCAGGAAGTTACGTGGGCTTAGCTCCTTTATCGCACCCAGGACATACCCCTCGCTTGCTCGAGGCTCAGCCAAGAC : 3397
JN  : GGGTTGAGAGCTCAAACGAGCAGGAAGTTACGTGGGCTTAGCTCCTTTATCGCACCCAGGACATACCCCTCGCTTGCTCGAGGCTCAGCCAAGAC : 3388
G   : GGGTTGAGAGCTCAAACGAGCAGGAAGTTACGTGGGCTTAGCTCCTTTATCGCACCCAGGACATACCCCTCGCTTGCTCGAGGCTCAGCCAAGAC : 3391
Nor : GGGTTGAGAGCTCAAACGAGCAGGAAGTTACGTGGGCTTAGCTCCTTTATCGCACCCAGGACATACCCCTCGCTTGCTCGGAGGCTCAGCCAAGAC : 3389

*      3420      *      3440      *      3460      *      3480      *      3500
JO1 : CTTTCGCGACGCGCGTTACCCCTGCCACCACCGTCAGTAGCTCTCAAGGTTCCACTTACCGCACCCCAATCAATCTTCTCCTCGACAGAAACAGTCGCAGA : 3497
JN  : CTTTCGCGACGCGCGTTACCCCTGCCACCACCGTCAGTAGCTCTCAAGGTTCCACTTACCGCACCCCAATCAATCTTCTCCTCGACAGAAACAGTCGCAGA : 3488
G   : CTTTCGCGACGCGCGTTACCCCTGCCACCACCGTCAGTAGCTCTCAAGGTTCCACTTACCGCACCCCAATCAATCTTCTCCTCGACAGAAACAGTCGCAGA : 3491
Nor : CTTTCGCGACGCGCGTTACCCCTGCCACCACCGTCAGTAGCTCTCAAGGTTCCACTTACCGCACCCCAATCAATCTTCTCCTCGACAGAAACAGTCGCAGA : 3489
      HEL V

```

図 2.11 続き

```

*          3520          *          3540          *          3560          *          3580          *          3600
J01 : CTGAGCAGCGCCGCTCGCTGGTCGCCGCCACTCGTTCCACCATGGCCATAAACAATGACGGGGGATCGGGATGTTCTCAACAGGGGCCACACAACAAC : 3597
JN  : CTGAGCAGCGCCGCTCGCTGGTCGCCGCCACTCGTTCCACCATGGCCATAAACAATGACGGGGGATCGGGATGTTCTCAACAGGGGCCACACAACAAC : 3588
G   : CTGAGCAGCGCCGCTCGCTGGTCGCCGCCACTCGTTCCACCATGGCCATAAACAATGACGGGGGATCGGGATGTTCTCAACAGGGGCCACACAACAAC : 3591
Nor : CTGAGCAGCGCCGCTCGCTGGTCGCCGCCACTCGTTCCACCATGGCCATAAACAATGACGGGGGATCGGGATGTTCTCAACAGGGGCCACACAACAAC : 3589

```

HEL VI

```

*          3620          *          3640          *          3660          *          3680          *          3700
J01 : CGGTGTTCTCTGCGCTTTTAAACGCCAATCTGATATCCCTGACAGCCGTGTTCCCAACGCTTTTCGCAAGTTGCCGATATACGCCACCGGATCACCAG : 3697
JN  : CGGTGTTCTCTGCGCTTTTAAACGCCAATCTGATATCCCTGACAGCCGTGTTCCCAACGCTTTTCGCAAGTTGCCGATATACGCCACCGGATCACCAG : 3688
G   : CGGTGTTCTCTGCGCTTTTAAACGCCAATCTGATATCCCTGACAGCCGTGTTCCCAACGCTTTTCGCAAGTTGCCGATATACGCCACCGGATCACCAG : 3691
Nor : CGGTGTTCTCTGCGCTTTTAAACGCCAATCTGATATCCCTGACAGCCGTGTTCCCAACGCTTTTCGCAAGTTGCCGATATACGCCACCGGATCACCAG : 3689

```

```

*          3720          *          3740          *          3760          *          3780          *          3800
J01 : TCGTAGGGGCATGCTGACCGGTGGCAACACCTTGTGGTGAAGGACGCTTATCATTGATTAAGAAGTCCGGCCGCTGAATGCTCCAGAGGTCGACGAT : 3797
JN  : TCGTAGGGGCATGCTGACCGGTGGCAACACCTTGTGGTGAAGGACGCTTATCATTGATTAAGAAGTCCGGCCGCTGAATGCTCCAGAGGTCGACGAT : 3788
G   : TCGTAGGGGCATGCTGACCGGTGGCAACACCTTGTGGTGAAGGACGCTTATCATTGATTAAGAAGTCCGGCCGCTGAATGCTCCAGAGGTCGACGAT : 3791
Nor : TCGTAGGGGCATGCTGACCGGTGGCAACACCTTGTGGTGAAGGACGCTTATCATTGATTAAGAAGTCCGGCCGCTGAATGCTCCAGAGGTCGACGAT : 3789

```

```

*          3820          *          3840          *          3860          *          3880          *          3900
J01 : ACTTCCCTCCCGACTTGGCGACGCCCTCTTCACCGGAATCTTGCCTGCTGTTCAGAGCAATGGCCGGCCCAATCCACTCAAGTCTCCGGCCACCA : 3897
JN  : ACTTCCCTCCCGACTTGGCGACGCCCTCTTCACCGGAATCTTGCCTGCTGTTCAGAGCAATGGCCGGCCCAATCCACTCAAGTCTCCGGCCACCA : 3888
G   : ACTTCCCTCCCGACTTGGCGACGCCCTCTTCACCGGAATCTTGCCTGCTGTTCAGAGCAATGGCCGGCCCAATCCACTCAAGTCTCCGGCCACCA : 3891
Nor : ACTTCCCTCCCGACTTGGCGACGCCCTCTTCACCGGAATCTTGCCTGCTGTTCAGAGCAATGGCCGGCCCAATCCACTCAAGTCTCCGGCCACCA : 3889

```

```

*          3920          *          3940          *          3960          *          3980          *          4000
J01 : TCACGCGGTTTATCCTGGTGAATCCCTTTGAAATCTCGCAGCACATTTCCCTCCCGCTCAGCAGCCCGAATTAAGGAGATCTTGACCCGGCGGAGTT : 3997
JN  : TCACGCGGTTTATCCTGGTGAATCCCTTTGAAATCTCGCAGCACATTTCCCTCCCGCTCAGCAGCCCGAATTAAGGAGATCTTGACCCGGCGGAGTT : 3988
G   : TCACGCGGTTTATCCTGGTGAATCCCTTTGAAATCTCGCAGCACATTTCCCTCCCGCTCAGCAGCCCGAATTAAGGAGATCTTGACCCGGCGGAGTT : 3991
Nor : TCACGCGGTTTATCCTGGTGAATCCCTTTGAAATCTCGCAGCACATTTCCCTCCCGCTCAGCAGCCCGAATTAAGGAGATCTTGACCCGGCGGAGTT : 3989

```

```

*          4020          *          4040          *          4060          *          4080          *          4100
J01 : CAGGCGCAGTTCCGATTCTCCTTAAACAGGATTTCTCTCTCCGGCAGCTTCCACGTTGATGCGGCAAAATCATGACTCCAAGCGGACCCGACG : 4097
JN  : CAGGCGCAGTTCCGATTCTCCTTAAACAGGATTTCTCTCTCCGGCAGCTTCCACGTTGATGCGGCAAAATCATGACTCCAAGCGGACCCGACG : 4088
G   : CAGGCGCAGTTCCGATTCTCCTTAAACAGGATTTCTCTCTCCGGCAGCTTCCACGTTGATGCGGCAAAATCATGACTCCAAGCGGACCCGACG : 4091
Nor : CAGGCGCAGTTCCGATTCTCCTTAAACAGGATTTCTCTCTCCGGCAGCTTCCACGTTGATGCGGCAAAATCATGACTCCAAGCGGACCCGACG : 4089

```

```

*          4120          *          4140          *          4160          *          4180          *          4200
J01 : CTGCTCGTCGCTCCATTACCAAGCGCTCCGCTTCGCGCCGAGCGATCTTCGTACACAGCTCTCCTCCAAGGACCAAATCTGGGCTTGACCCCTCACC : 4197
JN  : CTGCTCGTCGCTCCATTACCAAGCGCTCCGCTTCGCGCCGAGCGATCTTCGTACACAGCTCTCCTCCAAGGACCAAATCTGGGCTTGACCCCTCACC : 4188
G   : CTGCTCGTCGCTCCATTACCAAGCGCTCCGCTTCGCGCCGAGCGATCTTCGTACACAGCTCTCCTCCAAGGACCAAATCTGGGCTTGACCCCTCACC : 4191
Nor : CTGCTCGTCGCTCCATTACCAAGCGCTCCGCTTCGCGCCGAGCGATCTTCGTACACAGCTCTCCTCCAAGGACCAAATCTGGGCTTGACCCCTCACC : 4189

```

```

*          4220          *          4240          *          4260          *          4280          *          4300
J01 : ACAGTTGGTGGCCGAGCTTACAACCGCCACCCGAGGCAGTCCGTTCCATTGATGAGTTGCTGTTGCGGAGTGCATCAACATTAATGAGTTGGCGAGCT : 4297
JN  : ACAGTTGGTGGCCGAGCTTACAACCGCCACCCGAGGCAGTCCGTTCCATTGATGAGTTGCTGTTGCGGAGTGCATCAACATTAATGAGTTGGCGAGCT : 4288
G   : ACAGTTGGTGGCCGAGCTTACAACCGCCACCCGAGGCAGTCCGTTCCATTGATGAGTTGCTGTTGCGGAGTGCATCAACATTAATGAGTTGGCGAGCT : 4291
Nor : ACAGTTGGTGGCCGAGCTTACAACCGCCACCCGAGGCAGTCCGTTCCATTGATGAGTTGCTGTTGCGGAGTGCATCAACATTAATGAGTTGGCGAGCT : 4289

```

```

*          4320          *          4340          *          4360          *          4380          *          4400
J01 : CTCGAACAAGACCAAGAGCAGATCATTCGCAACGCCACCCGATCCGACCCCTGATGGCGCATCACAGCCGTAAAGATTTTACGAAAACCGCAGCACAAA : 4397
JN  : CTCGAACAAGACCAAGAGCAGATCATTCGCAACGCCACCCGATCCGACCCCTGATGGCGCATCACAGCCGTAAAGATTTTACGAAAACCGCAGCACAAA : 4388
G   : CTCGAACAAGACCAAGAGCAGATCATTCGCAACGCCACCCGATCCGACCCCTGATGGCGCATCACAGCCGTAAAGATTTTACGAAAACCGCAGCACAAA : 4391
Nor : CTCGAACAAGACCAAGAGCAGATCATTCGCAACGCCACCCGATCCGACCCCTGATGGCGCATCACAGCCGTAAAGATTTTACGAAAACCGCAGCACAAA : 4389

```

REP I

```

*          4420          *          4440          *          4460          *          4480          *          4500
J01 : ATCAATGAAGCCTCCATCTTTGGATCCTGGAAGGCTTGTGACAGCGTGGCTCTCATGCATGATTATGTGTTCTTTCTGGGTCCGGTCAAGAAATATAC : 4497
JN  : ATCAATGAAGCCTCCATCTTTGGATCCTGGAAGGCTTGTGACAGCGTGGCTCTCATGCATGATTATGTGTTCTTTCTGGGTCCGGTCAAGAAATATAC : 4488
G   : ATCAATGAAGCCTCCATCTTTGGATCCTGGAAGGCTTGTGACAGCGTGGCTCTCATGCATGATTATGTGTTCTTTCTGGGTCCGGTCAAGAAATATAC : 4491
Nor : ATCAATGAAGCCTCCATCTTTGGATCCTGGAAGGCTTGTGACAGCGTGGCTCTCATGCATGATTATGTGTTCTTTCTGGGTCCGGTCAAGAAATATAC : 4489

```

REP II

```

*          4520          *          4540          *          4560          *          4580          *          4600
J01 : AGCGCATCTTTGACTCCAAAGAGCGACCAGCCTAACGTGTATACCATGCTGGCCATCCCCCTTTGAGATGTCCGAGTGGGCCCAAAGCACTCGCAATC : 4597
JN  : AGCGCATCTTTGACTCCAAAGAGCGACCAGCCTAACGTGTATACCATGCTGGCCATCCCCCTTTGAGATGTCCGAGTGGGCCCAAAGCACTCGCAATC : 4588
G   : AGCGCATCTTTGACTCCAAAGAGCGACCAGCCTAACGTGTATACCATGCTGGCCATCCCCCTTTGAGATGTCCGAGTGGGCCCAAAGCACTCGCAATC : 4591
Nor : AGCGCATCTTTGACTCCAAAGAGCGACCAGCCTAACGTGTATACCATGCTGGCCATCCCCCTTTGAGATGTCCGAGTGGGCCCAAAGCACTCGCAATC : 4589

```

REP III

```

*          4620          *          4640          *          4660          *          4680          *          4700
J01 : AGGAATCTCTCACACAAAGACTACACAGCTTTGACCAAAAGCAATGCGGAGGCTGCTGCTTCGAGATGGCCAAATGCGCCGCTTGAGCATCCCC : 4697
JN  : AGGAATCTCTCACACAAAGACTACACAGCTTTGACCAAAAGCAATGCGGAGGCTGCTGCTTCGAGATGGCCAAATGCGCCGCTTGAGCATCCCC : 4698
G   : AGGAATCTCTCACACAAAGACTACACAGCTTTGACCAAAAGCAATGCGGAGGCTGCTGCTTCGAGATGGCCAAATGCGCCGCTTGAGCATCCCC : 4691
Nor : AGGAATCTCTCACACAAAGACTACACAGCTTTGACCAAAAGCAATGCGGAGGCTGCTGCTTCGAGATGGCCAAATGCGCCGCTTGAGCATCCCC : 4689

```

REP IV

図 2.11 続き





```

*      5920      *      5940      *      5960      *      5980      *      6000
JO1 : CCGAAGCTCAGCTCAACGCCTCTGACCCAAC TGGGTCTGGTCAACCGCACCACCGTCGCCACCGTGGTGGTGAGCGGCAAGCTGATGGTCTCCGACG : 5997
JN  : CCGAAGCTCAGCTCAACGCCTCTGACCCAAC TGGGTCTGGTCAACCGCACCACCGTCGCCACCGTGGTGGTGAGCGGCAAGCTGATGGTCTCCGACG : 5987
G   : CCGAAGCTCAGCTCAACGCCTCTGACCCAAC TGGGTCTGGTCAACCGCACCACCGTCGCCACCGTGGTGGTGAGCGGCAAGCTGATGGTCTCCGACG : 5990
Nor : CCGAAGCTCAGCTCAACGCCTCTGACCCAAC TGGGTCTGGTCAACCGCACCACCGTCGCCACCGTGGTGGTGAGCGGCAAGCTGATGGTCTCCGACG : 5989

```



```

*      6020      *      6040      *      6060      *      6080      *      6100
JO1 : CATTGGCCACACCCACACCCCTCGAGTAGCCCTTATTCAGCAATGTTTTGGGTAGTGGAGCCCTAGCCTCCACCTTTTCCTTTCCTCTGGCAATTAG : 6097
JN  : CATTGGCCACACCCACACCCCTCGAGTAGGACCCCTTATTCAGCAATGTTTTGGGTAGTGGAGCCCTAGCCTCCACCTTTTCCTTTCCTCTGGCAATTAG : 6087
G   : CATTGGCCACACCCACACCCCTCGAGTAGGACCCCTTATTCAGCAATGTTTTGGGTAGTGGAGCCCTAGCCTCCACCTTTTCCTTTCCTCTGGCAATTAG : 6090
Nor : CATTGGCCACACCCACACCCCTCGAGTAGGACCCCTTATTCAGCAATGTTTTGGGTAGTGGAGCCCTAGCCTCCACCTTTTCCTTTCCTCTGGCAATTAG : 6089

```

終止コドン

```

JO1 : CGCCTAAA : 6106
JN  : CGCCTAAA : 6095
G   : CGCCTAAA : 6099
Nor : CGCCTAAA : 6098

```

図 2.11 続き





```

*      1120      *      1140      *      1160      *      1180      *      1200
JO1 : QSSAKTLRDAGYPATTVSSSQSGSTYRTPINLLDRNSRRLSSAVSLVAATRSTMAINMTGDRDVLQQGPHNNPVFSALYNANLISLSLFPFLFAKLPIT : 1200
JN  : QSSAKTLRDAGYPATTVSSSQSGSTYRTPINLLDRNSRRLSSAVSLVAATRSTMAINMTGDRDVLQQGPHNNPVFSALYNANLISLSLFPFLFAKLPIT : 1196
G   : QSSAKTLRDAGYPATTVSSSQSGSTYRTPINLLDRNSRRLSSAVSLVAATRSTMAINMTGDRDVLQQGPHNNPVFSALYNANLISLSLFPFLFAKLPIT : 1197
Nor : RSSAKTLRDAGYPATTVSSSQSGSTYRTPINLLDRNSRRLSSAVSLVAATRSTMAINMTGDRDVLQQGPHNNPVFSALYNANLISLSLFPFLFAKLPIT : 1197

      HEL V      HEL VI

*      1220      *      1240      *      1260      *      1280      *      1300
JO1 : RTAITSRRGMLTGGNTSAGDDVVIDSRPGPLNAPEVDDFLPTWRRPLHRNLASAVHNSCPAQSTHVTPTAVYPGESFENLAHFLPAHDPEIKEI : 1300
JN  : RTAITSRRGMLTGGNTSAGDDVVIDSRPGPLNAPEVDDFLPTWRRPLHRNLASAVHNSCPAQSTHVTPTAVYPGESFENLAHFLPAHDPEIKEI : 1296
G   : RTAITSRRGMLTGGNTSAGDDVVIDSRPGPLNAPEVDDFLPTWRRPLHRNLASAVHNSCPAQSTHVTPTAVYPGESFENLAHFLPAHDPEIKEI : 1297
Nor : RTAITSRRGMLTGGNTSAGDDVVIDSRPGPLNAPEVDDFLPTWRRPLHRNLASAVHNSCPAQSTHVTPTAVYPGESFENLAHFLPAHDPEIKEI : 1297

*      1320      *      1340      *      1360      *      1380      *      1400
JO1 : LHRGEFSAQFPILLNQDFLSAQSSSTLIAAKHDSKRDFTLLVASITKRLRFRPSDSSYQLSSKDQILGLTLYHWCRAYNRHPQAVVPDELLFAECINI : 1400
JN  : LHRGEFSAQFPILLNQDFLSAQSSSTLIAAKHDSKRDFTLLVASITKRLRFRPSDSSYQLSSKDQILGLTLYHWCRAYNRHPQAVVPDELLFAECINI : 1396
G   : LHRGEFSAQFPILLNQDFLSAQSSSTLIAAKHDSKRDFTLLVASITKRLRFRPSDSSYQLSSKDQILGLTLYHWCRAYNRHPQAVVPDELLFAECINI : 1397
Nor : LHRGEFSAQFPILLNQDFLSAQSSSTLIAAKHDSKRDFTLLVASITKRLRFRPSDSSYQLSSKDQILGLTLYHWCRAYNRHPQAVVPDELLFAECINI : 1397

*      1420      *      1440      *      1460      *      1480      *      1500
JO1 : NEFAQSSNKTSTIIANASRSDPDWRITAVKIFSKTQHKINEASIFGSWKACQTLALMHDYVVLFLGPVKYQRI FDSQERPANVYHAGHSPLMSEWA : 1500
JN  : NEFAQSSNKTSTIIANASRSDPDWRITAVKIFSKTQHKINEASIFGSWKACQTLALMHDYVVLFLGPVKYQRI FDSQERPANVYHAGHSPLMSEWA : 1496
G   : NEFAQSSNKTSTIIANASRSDPDWRITAVKIFSKTQHKINEASIFGSWKACQTLALMHDYVVLFLGPVKYQRI FDSQERPANVYHAGHSPLMSEWA : 1497
Nor : NEFAQSSNKTSTIIANASRSDPDWRITAVKIFSKTQHKINEASIFGSWKACQTLALMHDYVVLFLGPVKYQRI FDSQERPANVYHAGHSPLMSEWA : 1497

      REP I      REP II      REP III

*      1520      *      1540      *      1560      *      1580      *      1600
JO1 : QKHLRSGISHNTDYTAFDQSQHGEAVVFEMAKMRRLSIPESLINLHLSYLKRNVDTFQGPLTCMRLTGEPGTYYDNTDYNLAVIYSKYLVDHPIMVSGDD : 1600
JN  : QKHLRSGISHNTDYTAFDQSQHGEAVVFEMAKMRRLSIPESLINLHLSYLKRNVDTFQGPLTCMRLTGEPGTYYDNTDYNLAVIYSKYLVDHPIMVSGDD : 1596
G   : QKHLRSGISHNTDYTAFDQSQHGEAVVFEMAKMRRLSIPESLINLHLSYLKRNVDTFQGPLTCMRLTGEPGTYYDNTDYNLAVIYSKYLVDHPIMVSGDD : 1597
Nor : QKHLRSGISHNTDYTAFDQSQHGEAVVFEMAKMRRLSIPESLINLHLSYLKRNVDTFQGPLTCMRLTGEPGTYYDNTDYNLAVIYSKYLVDHPIMVSGDD : 1597

      REP IV      REP V      REP VI

*      1620      *      1640      *      1660      *      1680      *      1700
JO1 : SVIGGNPTVSRNWPAAIEKLLALRFKTESTKHPFCGYVVGPAAIRSPITLFAKIMSAVDDLSIDDKLASYLSEFAIGHSLGHDFWDLLEPIDQVPYQSAV : 1700
JN  : SVIGGNPTVSRNWPAAIEKLLALRFKTESTKHPFCGYVVGPAAIRSPITLFAKIMSAVDDLSIDDKLASYLSEFAIGHSLGHDFWDLLEPIDQVPYQSAV : 1696
G   : SVIGGNPTVSRNWPAAIEKLLALRFKTESTKHPFCGYVVGPAAIRSPITLFAKIMSAVDDLSIDDKLASYLSEFAIGHSLGHDFWDLLEPIDQVPYQSAV : 1697
Nor : SVIGGNPTVSRNWPAAIEKLLALRFKTESTKHPFCGYVVGPAAIRSPITLFAKIMSAVDDLSIDDKLASYLSEFAIGHSLGHDFWDLLEPIDQVPYQSAV : 1697

      REP VII      REP VIII

*      1720      *      1740      *      1760      *      1780      *      1800
JO1 : YDFFCRHASREQKQILNIGEVDPDTVLSIASHLRFASRALYCLLPSSVRRALTSKKTVTDAFEDPDVSHMQGELLQNFQESNITKLRGADMSDQVVKQLE : 1800
JN  : YDFFCRHASREQKQILNIGEVDPDTVLSIASHLRFASRALYCLLPSSVRRALTSKKTVTDAFEDPDVSHMQGELLQNFQESNITKLRGADMSDQVVKQLE : 1796
G   : YDFFCRHASREQKQILNIGEVDPDTVLSIASHLRFASRALYCLLPSSVRRALTSKKTVTDAFEDPDVSHMQGELLQNFQESNITKLRGADMSDQVVKQLE : 1797
Nor : YDFFCRHASREQKQILNIGEVDPDTVLSIASHLRFASRALYCLLPSSVRRALTSKKTVTDAFEDPDVSHMQGELLQNFQESNITKLRGADMSDQVVKQLE : 1797

*      1820      *      1840      *      1860      *      1880      *      1900
JO1 : SNHVDSTPSLIPRPPFQGGSRTPVFPQTVAMDVVAAGGNATFNLAGHVLSSEITAPYRKARLAELKAIVCPTAASFQSPITLDELVWSTNNVIFDQLQV : 1900
JN  : SNHVDSTPSLIPRPPFQGGSRTPVFPQTVAMDVVAAGGNATFNLAGHVLSSEITAPYRKARLAELKAIVCPTAASFQSPITLDELVWSTNNVIFDQLQV : 1896
G   : SNHVDSTPSLIPRPPFQGGSRTPVFPQTVAMDVVAAGGNATFNLAGHVLSSEITAPYRKARLAELKAIVCPTAASFQSPITLDELVWSTNNVIFDQLQV : 1897
Nor : SNHVDSTPSLIPRPPFQGGSRTPVFPQTVAMDVVAAGGNATFNLAGHVLSSEITAPYRKARLAELKAIVCPTAASFQSPITLDELVWSTNNVIFDQLQV : 1897

*      1920      *      1940      *      1960      *      1980      *
JO1 : YGGTRFAIGGPLLSHTYELRADLSYLNVPVKDSVSYVDTPKLTINASDPTGSGSTATTVATVLSGKLVSDALATPPLLE----- : 1981
JN  : YGGTRFAIGGPLLSHTYELRADLSYLNVPVKDSVSYVDTPKLTINASDPTGSGSTATTVATVLSGKLVSDALATPPLLE----- : 1986
G   : YGGTRFAIGGPLLSHTYELRADLSYLNVPVKDSVSYVDTPKLTINASDPTGSGSTATTVATVLSGKLVSDALATPPLLE----- : 1987
Nor : YGGTRFAIGGPLLSHTYELRADLSYLNVPVKDSVSYVDTPKLTINASDPTGSGSTATTVATVLSGKLVSDALATPPLLE----- : 1978

```

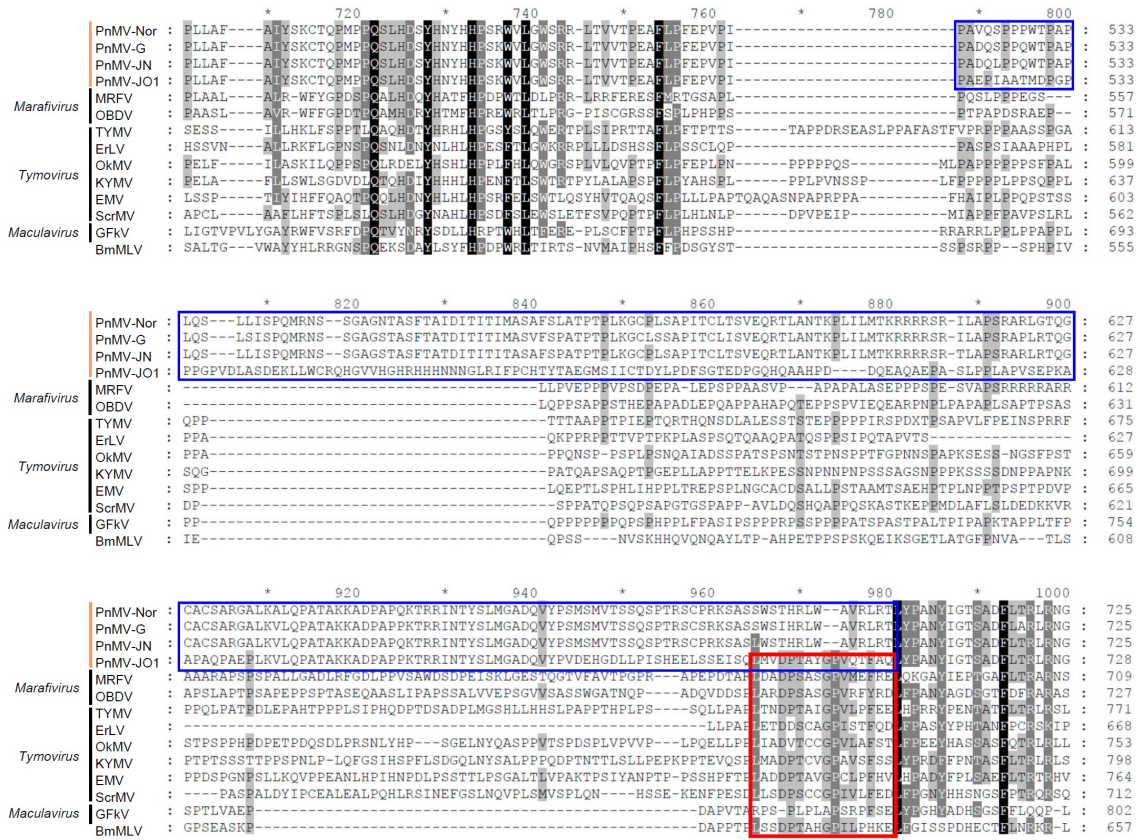
CP



図 2.12 続き

フレームシフト領域についてより詳細に解析するため、さらに *Tymovirus* 属、*Marafivirus* 属、*Maculavirus* 属に属するウイルスの RdRp のアミノ酸配列を加え、*Tymovirus* 科ウイルス全体のアライメント図を作成した。その際に *Marafivirus* 属の maize rayado fino virus (MRFV)、oat blue dwarf virus (OBDV) の配列を用いた。*Tymovirus* 属からは turnip yellow mosaic virus (TYMV)、erysimum latent virus (ErLV)、okra mosaic virus (OkMV)、kennedya yellow mosaic virus (KYMV)、eggplant mosaic virus (EMV)、scrophularia mottle virus (ScrMV) の配列を用いた。また、*Maculavirus* 属からは grapevine fleck virus (GFkV) の配列を用い、さらに未帰種の bombyx mori macula-like latent virus (BmMLV) の配列を用いた。その結果、各ドメイン領域内においては *Tymovirus* 科ウイルス間でのアミノ酸配列の保存性が比較的高く、ドメイン間領域では保存性が低いことが明らかとなった。PnMV のフレームシフト領域に該当する領域においては、*Tymovirus* 科のウイルス間でアミノ酸配列の保存性がほとんどみられなかった (図 2.13 (a))。しかし C 末端の 16 アミノ酸に注目してみると、*Tymovirus* 属、*Marafivirus* 属、*Maculavirus* 属に保存されたアミノ酸配列が存在していた (図 2.13 (b))。この 16 アミノ酸の保存配列は *Tymovirus* 属、*Marafivirus* 属、*Maculavirus* 属に共通して存在したことから、*Tymovirus* 科の共通祖先においてもこの保存配列が存在していたことが示唆された。そのためこの保存配列を「祖先型アミノ酸モチーフ」と呼ぶこととした。この祖先型アミノ酸モチーフは PnMV-JO1 の RdRp にも保存されていた一方で、PnMV-JN, G, Nor には見出されなかった (図 2.13 (b))。以上より、PnMV-JO の RdRp は、PnMV-JN, -G, -Nor と比較して *Tymovirus* 科の共通祖先の RdRp により近い特徴を持つと考えられた。

(a)



(b)

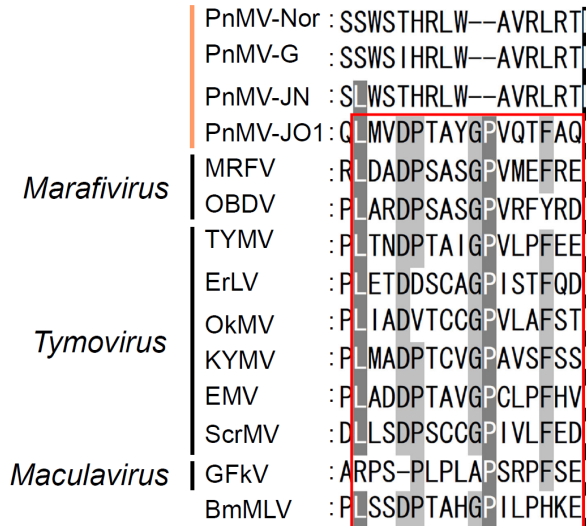


図 2.13 PnMV と *Tymovirus* 科他種ウイルスのフレームシフト領域周辺のアミノ酸配列の比較

(a) PnMV と *Tymovirus* 科他種ウイルスを含めたフレームシフト領域周辺のアミノ酸配列のアライメント図。

青色で示した部分は PnMV で見出されたフレームシフト領域を表す。赤色で示した部分は祖先型アミノ酸モチーフを表す。(b) (a) の祖先型アミノ酸モチーフの拡大図。

### 3.4.2 CP 配列の比較解析

次に PnMV 各分離株の CP の配列について比較解析を行ったところ、いずれの分離株間の比較においても、塩基配列レベルでは 96%以上の高い相同性を示した。特に、アミノ酸配列レベルでは、PnMV-JO1 と PnMV-Nor および PnMV-JN と PnMV-G のそれぞれの組み合わせでは 99%の高い相同性を示した。一方で、それ以外の組み合わせでは 94.7%と、やや低い値を示した (表 2.3 (c))。PnMV-Nor の CP 遺伝子領域では、PnMV-G と比較した場合、3'末端領域付近に一塩基の挿入があり、フレームシフトが生じることが報告されている。その結果、PnMV-Nor の CP は PnMV-G と比較して 9 アミノ酸短くなっており、C 末端のアミノ酸配列 13 アミノ酸のうち 11 アミノ酸が異なっていると報告されている (Spetz et al., 2008)。同様に PnMV-JO1, -JN について解析を行ったところ、PnMV-JO1 の CP は PnMV-Nor と同様のフレームシフトを生じ、9 アミノ酸短くなっていた (図 2.12)。一方で PnMV-JN の CP には塩基の挿入はなく、PnMV-G の CP と同じ長さであった (図 2.12)。

以上より、PnMV のゲノムには分離株間で多数の挿入/欠失が見られ、その結果 RdRp のドメイン間領域と CP の C 末端領域のアミノ酸配列は多様性に富んでいることが明らかとなった。

## 3.5 系統解析

### 3.5.1 *Tymovirus* 科ウイルス間の系統解析

本研究において配列を決定した 4 つの PnMV-JO および PnMV-JN の分類学的位置づけを明らかにするため、既報の PnMV-G, -Nor および *Tymovirus* 科に属するウイルスの配列を用いた系統解析を行った。解析には、*Tymovirus* 属の EMV、ErLV、KYMV、OkMV、ScrMV、TYMV、*Marafivirus* 属の OBDV、MRFV、citrus sudden death-associated virus (CsDaV)、*Maculavirus* 属の GFkV、および暫定種の grapevine red glove virus (GRGV) の配列を用いた。GRGV については、CP 部位についてのみ全塩基配列が公開されているため、CP における系統解析のみに用いた。また未帰属種の BmMLV も用いた。

まず RdRp のアミノ酸配列に基づき系統解析を行った (図 2.14 (a))。その結果、*Tymovirus* 属、*Marafivirus* 属、*Maculavirus* 属ウイルスのそれぞれがクラスターを形成した。4 つの PnMV-JO および PnMV-JN は、既報の PnMV-G, -Nor と共に、高いブートストラップ値で *Tymovirus* 属、*Marafivirus* 属、*Maculavirus* 属のいずれとも独立したひとつのクラスターを形成した。続いて CP のアミノ酸配列に基づいた系統解析を行った (図 2.14 (b))。その結果、ErLV が *Tymovirus* 属のクラスターから外れたものの、RdRp の系統樹と同様に、3 属がそれぞれひとつのクラスターを形成し、7 つの PnMV 分離株は、高いブートストラップ値で他の 3 属から独立した単一のクラスターを形成した。

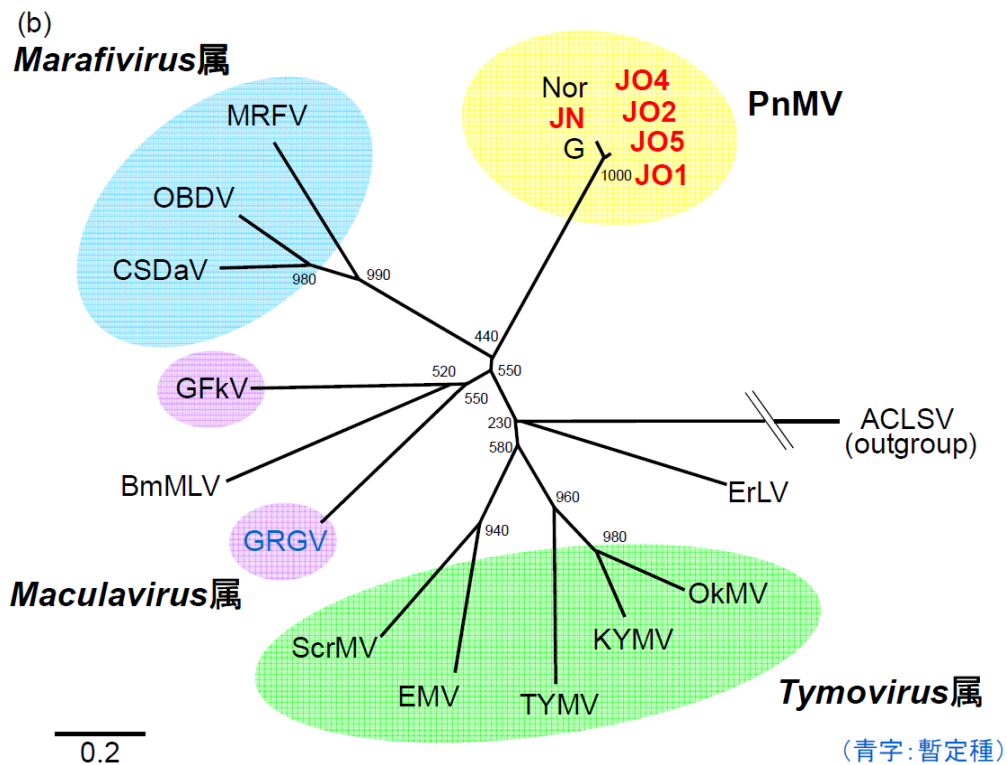
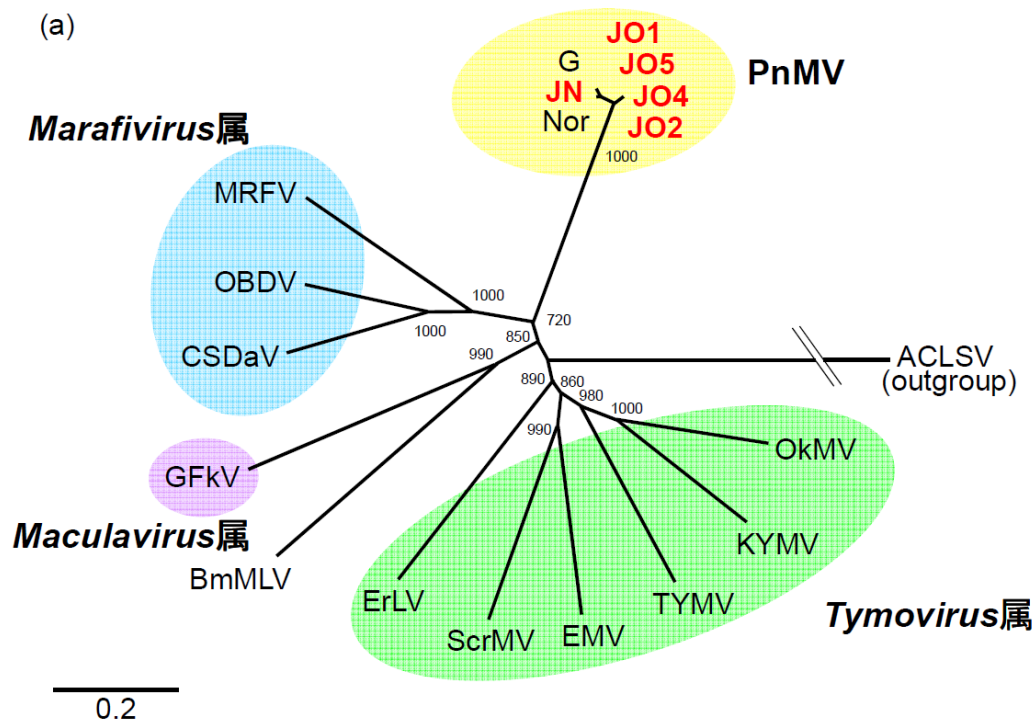


図 2.14 PnMV と他の *Tymovirus* 科ウイルスの RdRp (a) および CP (b) のアミノ酸配列における系統樹  
 青字は暫定種を示す。数字は 1000 回の試行におけるブートストラップ値。



### 3.5.2 PnMV 分離株間の系統解析

次に PnMV 全 7 分離株間の系統関係について解析を行った。上記のフレームシフトの影響を排除するため、アミノ酸配列ではなく、全塩基配列に基づいた系統樹を作成した。アウトグループとしては *Marafivirus* 属の MRFV を用いた。その結果、4 つの JO 分離株同士は非常に近縁であり、JN, G, Nor 分離株とは異なる単一のクラスターを形成した (図 2.15)。また JN, G 分離株も他の分離株と独立したクラスターを形成し、Nor 分離株は他の分離株からやや外れた系統であることが明らかとなった。図 2.15 は complete deletion の設定で作成した系統樹であるが、pairwise deletion の設定で作成した場合も、同様の系統関係が推定されたため、アライメント上のギャップは分離株間の系統関係には大きな影響は与えないと考えられた。

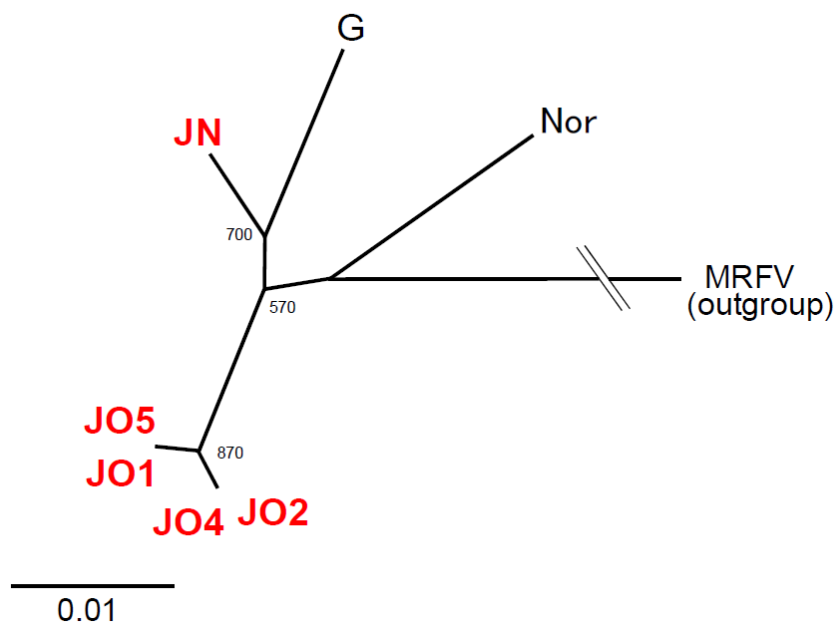


図 2.15 PnMV-JO1, -JO2, -JO4, -JO5, -JN, -G, -Nor の全塩基配列に基づいた系統樹

アウトグループとして *Marafivirus* 属の MRFV を用いた。数字は 1000 回の試行におけるブートストラップ値。

### 3.6 配列の比較解析に基づく病徴決定因子の推定

病徴の有無を決定するウイルス因子を明らかにする目的で、4 つの PnMV-JO 分離株について、配列相同性解析を行った。その結果、全塩基配列および全アミノ酸配列いずれにおいても 99%以上の非常に高い値を示した (表 2.4)。分離株間のアミノ酸置換について解析

した結果、JO2-JO4間ではひとつも見出されなかったが、その他の組み合わせではいくつか見出された。JO1に対してJO2 (JO4), JO5を比較すると、いずれも2アミノ酸の置換が見られた。JO2 (JO4) に対してJO5を比較すると、3個の置換が見られた。その中でもHEL-REPドメイン間領域に当たる1218番目のアミノ酸は病徴型と相関性のある多型 [JO1, JO5 (病徴あり): Thr; JO2, JO4 (無病徴): Ile] となっていた (図 2.7)。したがって、RdRpのHELドメインとREPドメインの間に存在する1218番目のアミノ酸残基が病徴の有無を決定している可能性が考えられた。

	JO1	JO2	JO4	JO5
JO1		99.7	99.7	99.7
JO2	99.9		100	99.5
JO4	99.9	100		99.5
JO5	99.8	99.8	99.8	

表 2.4 PnMV-JO1, -JO2, -JO4, -JO5 分離株間の相同性

斜線の上側は全塩基配列、下側は全アミノ酸配列の相同性を示す。

#### 4. 考察

本研究では、関東地方で栽培されたポインセチアからポインセチアモザイクウイルスの4つの分離株 JO1, JO2, JO4, JO5 を分離し、既に日本で分離されていた JN 分離株も合わせて全塩基配列を決定した後、遺伝子構造を明らかにした。いずれの分離株も、ゲノム上に予測される ORF やコードされるタンパク質のモチーフ等のゲノム構造が、既に全長塩基配列が報告されている、海外の PnMV 分離株と類似していた。次いで、近縁ウイルスとの配列比較により、JO および JN 分離株の遺伝子発現様式を予測したところ、JO および JN 分離株のコードするポリプロテインは、RdRp 内部の PRO-HEL 間および HEL-REP 間、および RdRp-CP 間で自己切断される可能性が示唆された。さらに CP の上流配列の比較解析により、CP はポリプロテインの切断に加え、サブゲノム RNA を介しても発現している可能性が示唆された。次に既報の分離株を含めた全分離株間で配列の比較を行ったところ、4つの JO 分離株には JN 分離株および海外分離株と比較して、RdRp の MTR-PRO ドメイン間領域に計 9 塩基の分散した塩基挿入が見出された。その結果 8 回のフレームシフトが生じること

により、JO 分離株の RdRp のアミノ酸配列は、特に MTR-PRO ドメイン間領域において、他の分離株と大きく異なることが明らかとなった。系統解析の結果、JO および JN 分離株は既報の PnMV 分離株とともに、*Tymovirus* 科の他属ウイルスとは独立した単一のクラスターを形成することが明らかとなった。続いて JO 分離株間で塩基配列ならびにアミノ酸配列の比較解析を行ったところ、病徴型と相関する RdRp 内の 1 アミノ酸変異が見出され、当該アミノ酸残基が病原性の決定に関与することが示唆された。

#### 4.1 PnMV の病原性に関与する因子

本研究で全長塩基配列を決定した 4 つの PnMV-JO 分離株のうち、JO1 および JO5 はモザイク病徴を呈するポインセチア、JO2 および JO4 は無病徴のポインセチアに由来する。病原性に関与する遺伝子を特定するため、分離株間の遺伝子配列の比較を行った。アミノ酸の置換数を調べたところ、4 つの分離株間で 0~3 個のアミノ酸置換が見出され、その中で HEL-REP ドメイン間領域の中に存在する 1218 番目のアミノ酸は唯一病徴型と相関のある多型 (JO1, JO5: Thr; JO2, JO4: Ile) となっていた (図 2.7)。HEL-REP ドメイン間領域は、*Tymovirus* 科 *Tymovirus* 属の TYMV において自己切断が生じると報告されている領域である。この切断は、切断部位の上流の 7 アミノ酸 から下流の 2 アミノ酸にかけての 9 アミノ酸残基を Pro が認識することにより生じる (Bransom et al., 1991; Bransom et al., 1996)。PnMV-JO、-JN 分離株の RdRp が TYMV と同様の自己切断を受ける可能性を検証するため、当該領域のアミノ酸配列を用いてアライメントを作成し比較解析を行ったところ、PnMV 全分離株において TYMV の自己切断に重要なアミノ酸が保存されていた (図 2.13)。よって PnMV の RdRp は HEL-REP 間で自己切断される可能性が考えられた。興味深いことに、上述の病徴型と相関のある 1218 番目のアミノ酸は、この推定切断部位より 2 アミノ酸だけ下流のアミノ酸に相当していた。この 1 アミノ酸残基の置換は、HEL-REP ドメイン間における切断効率、もしくは、切断によって生じる REP タンパク質の性質に影響を与え、ウイルス複製効率などに影響を与えた結果、病徴の誘導に関与している可能性が考えられた。このアミノ酸残基は、PnMV-JN、-G、-Nor において全て病徴型の Thr となっている。JN, G, Nor 分離株は葉にモザイクを示すポインセチアから分離されたため (Bradel, et al., 2000; Spetz, et al., 2009; 難波ら, 1987)、JO 分離株で見出された塩基と病原性の相関性に合致する。今後の検討課題としては、PnMV の感染性クローンを構築し、当該アミノ酸置換変異を導入した変異ウイルスを構築し、接種試験を行うことで、この 1218 番目のアミノ酸がモザイク病徴を決定する可能性を検証することが必須である。

#### 4.2 PnMV 分離株間に見出されたアミノ酸配列の多様性について

PnMV の遺伝的多様性について解析するため、本研究で分離した PnMV-JO、-JN と既報の

分離株 PnMV-G, -Nor との間で比較解析を行った。その結果、PnMV-JO1 では PnMV-JN, -G, -Nor と比較して、MTR-PRO ドメイン間領域に散在的な 9 塩基の挿入が見られ、8 回のフレームシフトが生じ、RdRp の当該領域約 150 アミノ酸の配列が他の分離株と大きく異なっていることあることが明らかになった。さらにフレームシフト領域の特徴を調べるため、*Tymovirus* 科の他属のウイルスの配列を加えて比較した結果、PnMV のフレームシフト領域に該当する領域の C 末端の 16 アミノ酸において、*Tymovirus* 属、*Marafivirus* 属、*Maculavirus* 属および PnMV-JO 分離株に共通して保存される祖先型アミノ酸モチーフが存在していた。その一方で、当該祖先型アミノ酸モチーフは PnMV-JN, -G, -Nor には見出されなかった。したがって、PnMV-JO の RdRp は、PnMV-JN, -G, -Nor と比較して *Tymovirus* 科ウイルスの共通祖先の RdRp により近い特徴を持つと考えられた。加えて、一般的に RNA ウイルスのゲノムに生じる変異のうち、塩基の挿入よりも塩基の欠失の方がはるかに生じやすいと言われている (Pita et al., 2007)。そのため PnMV-JO ゲノムで見出された塩基の挿入は、むしろ既報の PnMV-JN, -G, -Nor ゲノムに生じた塩基の欠失である可能性が高い。すなわち PnMV の共通祖先の RdRp 遺伝子は PnMV-JO 型であり、そこから 9 塩基の欠失が生じて PnMV-JN, -G, -Nor 型が生じたと考えられる。続いて CP 配列の比較解析を行った。PnMV-Nor の CP 遺伝子領域では、PnMV-G と比較した場合、3'末端領域付近に一塩基の挿入があり、フレームシフトが生じ 9 アミノ酸短くなると報告されている (Spetz et al., 2008)。同様に PnMV-JO1, -JN について解析を行ったところ、PnMV-JO1 の CP は PnMV-Nor と同様のフレームシフトを生じ、9 アミノ酸分だけ短いものとなっていた。一方で PnMV-JN の CP には塩基の挿入はなく、PnMV-G の CP と同じ長さであった (図 2.9)。

このように PnMV の RdRp のドメイン間領域のみならず CP 部位にも塩基挿入によるフレームシフトが見出された。このように PnMV のゲノム中には多数のフレームシフトが見出されたことから、PnMV はゲノム上に塩基の欠失を非常に生じやすいウイルスであり、フレームシフトを介して自身のタンパク質のアミノ酸配列をダイナミックに変化させ、遺伝的多様性を生じてきた可能性が示唆された。以上より、PnMV 分離株が祖先から分化してきた過程についてモデル図を示す (図 2.16)。まず、PnMV の共通祖先に RdRp 遺伝子に塩基欠失を生じたものが JN, G, Nor 分離株の共通祖先として分化し、欠失しなかったものが JO 分離株の祖先となったと考えられる。さらにその後、JN, G, Nor 分離株の共通祖先の CP 遺伝子に一塩基の欠失を生じたものが JN, G 分離株の共通祖先として分化し、欠失を生じなかったものが Nor 分離株の祖先となったと考えられる。全塩基配列を基にした系統樹 (図 2.12) においては、まず Nor 分離株が他の分離株から分化しているが、このモデル図では、JO 分離株がまず他の分離株から分化したのちに、Nor 分離株が JN, G 分離株から分化している。系統樹に従うと、Nor 分離株と JN, G 分離株が分化した後、それぞれのゲノム上の完全に同じ位置の塩基が 9 箇所欠失したことになり、この可能性は非常に低いと考えられる。このモデル図のように、RdRp 遺伝子から 9 塩基が欠失した後に Nor 分離株が JN, G 分離株から分化したと考えるのが、最も節約的であると考えられる。

以上のように、4つのJO分離株は他の分離株とアミノ酸配列が大きく異なっているため、今後感染性クローンを作製、接種試験を行って、ポインセチアへの感染性を確認することが必須である。

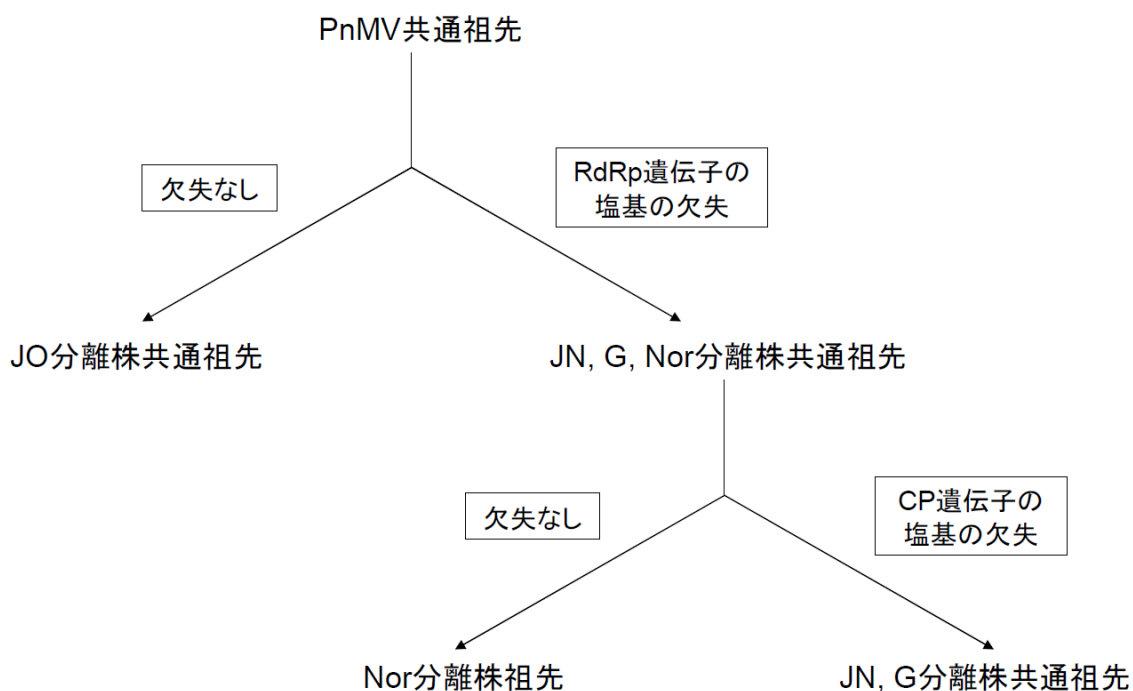


図 2.16 PnMV 分離株の分化の過程のモデル図

#### 4.3 PnMV の遺伝子発現様式

本研究により得られた PnMV-JO, -JN 分離株の配列情報から、いずれの分離株も、ゲノム上に一つの大きな ORF を持ち、そこに推定分子量約 220 kDa のタンパク質をコードすることが明らかとなった。このタンパク質上には RdRp の 4 つの保存ドメイン (MTR, PRO, HEL, REP) および CP の保存配列が存在したが、これらの境界となるような終止コドンは存在しなかった。これらの結果から JO, JN 分離株においても、既報の G, Nor 分離株と同様、RdRp と CP が融合タンパク質としてコードされるという PnMV ゲノムの構造を再確認することができた。

PnMV の CP の発現様式に関しては、サブゲノム RNA を介した発現と、ポリタンパク質の切断を介した 2 つの可能性が考えられる。Tymovirus 科の Tymovirus 属、Marafivirus 属のウイルスでは、CP 遺伝子の上流域に、CP のサブゲノム RNA のプロモーター配列 (Tymovirus

属においては *tymobox*、*Marafivirus* 属においては *marafibox*)、および転写開始点を示す initiation box が保存されている (Ding et al., 1990; Schirawski et al., 2000)。既報の PnMV-G は *tymobox* および initiation box に相当する塩基配列を持ち、サブゲノム RNA と思われる約 650 塩基の RNA も見出されていることから、PnMV-G の CP は翻訳開始点の 31 塩基上流 (5414 番目塩基) から転写されるサブゲノム RNA を介して発現されると推定されている (Bradel et al., 2000)。またウエスタンブロット解析の結果 から、PnMV の CP の分子量は 21 kDa であること (難波ら、1987; Bradel et al., 2000) もこのサブゲノム RNA を介した CP の発現を支持している。*tymobox* および initiation box について PnMV 分離株と *Marafivirus* 属ウイルス および *Tymovirus* 属ウイルスで比較したところ、全ての PnMV 分離株で CP の翻訳開始点の上流に *Marafivirus* 属ウイルスや *Tymovirus* 属ウイルス配列の *tymobox* と initiation box に良く似た配列がそれぞれ保存されていた (図 2.10)。よって全ての PnMV 分離株において CP はサブゲノム RNA を介して発現している可能性が示唆された。*Marafivirus* 属に分類される OBDV では、サブゲノム RNA を介し CP が発現するのに加え、ポリタンパク質として翻訳された RdRp-CP の境界領域が Pro ドメインの活性により切断され、RdRp と CP が発現する (Edwards et al., 1997)。切断によって発現する CP はサブゲノム RNA を介して発現する CP よりもサイズがやや大きいことが知られている (Edwards et al., 1997)。PnMV はゲノム構造が OBDV に類似しており RdRp と CP がポリタンパク質としてコードされることから、同様に 2 種類の CP が発現している可能性がある。そこで、PnMV-JO1, -JN, -G および -Nor のポリタンパク質の配列を *Marafivirus* 属ウイルスのそれとアラインメントしたのち、*Marafivirus* 属で保存性の高い切断サイト付近におけるアミノ酸配列を比較したところ (図 2.9)、このアミノ酸配列は、PnMV においても保存されていた。このことから、PnMV はポリタンパク質の切断によっても CP を発現している可能性が考えられた。PnMV のウイルス粒子を構成するタンパク質には、PnMV-G でも PnMV-JN でも 21 kDa の単一の CP しか検出されていない (難波ら、1987; Bradel et al., 2000)。しかし *Marafivirus* 属ウイルスの場合とは異なり、PnMV の切断部位と思われる箇所は CP の翻訳開始点と 1 アミノ酸しか離れておらず、非常に近接しているため、切断が行われていたとしてもサブゲノムを介して発現する CP と区別することは難しい。これについては、推定 *tymobox* や推定 initiation box を破壊した感染性 cDNA クローンを作成後、植物に接種した後にウエスタンブロットにより CP が検出されるかを解析することで、切断がおきているかどうかを詳細に判定する必要があると考えられる。

## 第 3 章 植物によるウイルス増殖抑制機構を抑止するウイルス因子の解析

### 1. 序文

#### 1.1 ウイルス防御機構としての RNA サイレンシングと tasiRNA 経路

RNAサイレンシングは、真核生物に共通した、塩基配列特異的な遺伝子発現調節機構である。植物においては、ウイルスに対する防御機構としても重要な役割を果たす (Ding and Voinnet, 2007)。これまでの研究により、ウイルス防御機構としてのRNAサイレンシングについて詳細な分子メカニズムが明らかになっている (図3.1)。シロイヌナズナでは、植物ウイルスが細胞内に侵入すると、シロイヌナズナゲノム内にコードされる4つのRNase III様二本鎖RNA分解酵素であるDicer-likeタンパク質 (DCL) のうち、DCL4, DCL2およびDCL3が、ウイルスRNAの高次構造部や複製中間体の二本鎖RNAを認識し、それぞれ21、22、24 塩基のsmall interfering RNA (siRNA) が切り出される (Blevins et al., 2006; Deleris et al., 2006; Diaz-Pendon et al., 2007; Garcia-Ruiz et al., 2010; Jakubiec et al., 2011; Qu et al., 2008; Wang et al., 2011)。切り出されたウイルス由来siRNA (virus-derived siRNA、vsiRNA) は、シロイヌナズナゲノム内にコードされる10個のARGONAUTEのうち、AGO1と特異的に結合してその他の因子とともにRNA induced silencing complex (RISC) と呼ばれる複合体を形成する。形成されたRISCは、RISC内部に含まれるsiRNAの塩基配列に従って、ウイルスRNAのうち相補的な配列を有する箇所を認識し切断する (Azevedo et al., 2010; Morel et al., 2002; Qu et al., 2008; Wang et al., 2011; Zhang et al., 2006)。

さらに、ウイルスに対するRNAサイレンシングは、上述した初期段階を含めて複数の段階からなっており、大まかに「開始 (initiation)」、「増幅 (amplification)」、「全身拡大 (systemic movement)」に分けられる (図3.1; Ding and Voinnet, 2007)。RNAサイレンシングは、ウイルスRNAの高次構造部や複製中間体からprimary vsiRNAと呼ばれるsiRNAが切り出されることにより開始される。次に、RNAサイレンシングはtransitive silencingと呼ばれる過程を通じて増幅される (Donaire et al., 2008; Garcia-Ruiz et al., 2010; Wang et al., 2010)。この過程では、primary vsiRNAを取り込んだRISCによって、ウイルスRNA が切断される。切断により生じたウイルスRNAの断片は、5'末端や3'末端の構造が通常のmRNAとは異なる異常なRNAとして、RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 6 (RDR6) / SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3 (SGS3) 複合体により認識され、相補鎖合成により二本鎖RNAが生じる。二本鎖RNAからは、DCL4によって21 塩基のvsiRNA (secondary vsiRNA) が切り出され、再び配列特異的なウイルスRNA の切断を生じる (Wang et al., 2011)。以上の過程を通じて、vsiRNAが連鎖的に増加することでRNAサイレンシングは増幅される。RDR6やSGS3の欠損変異体において

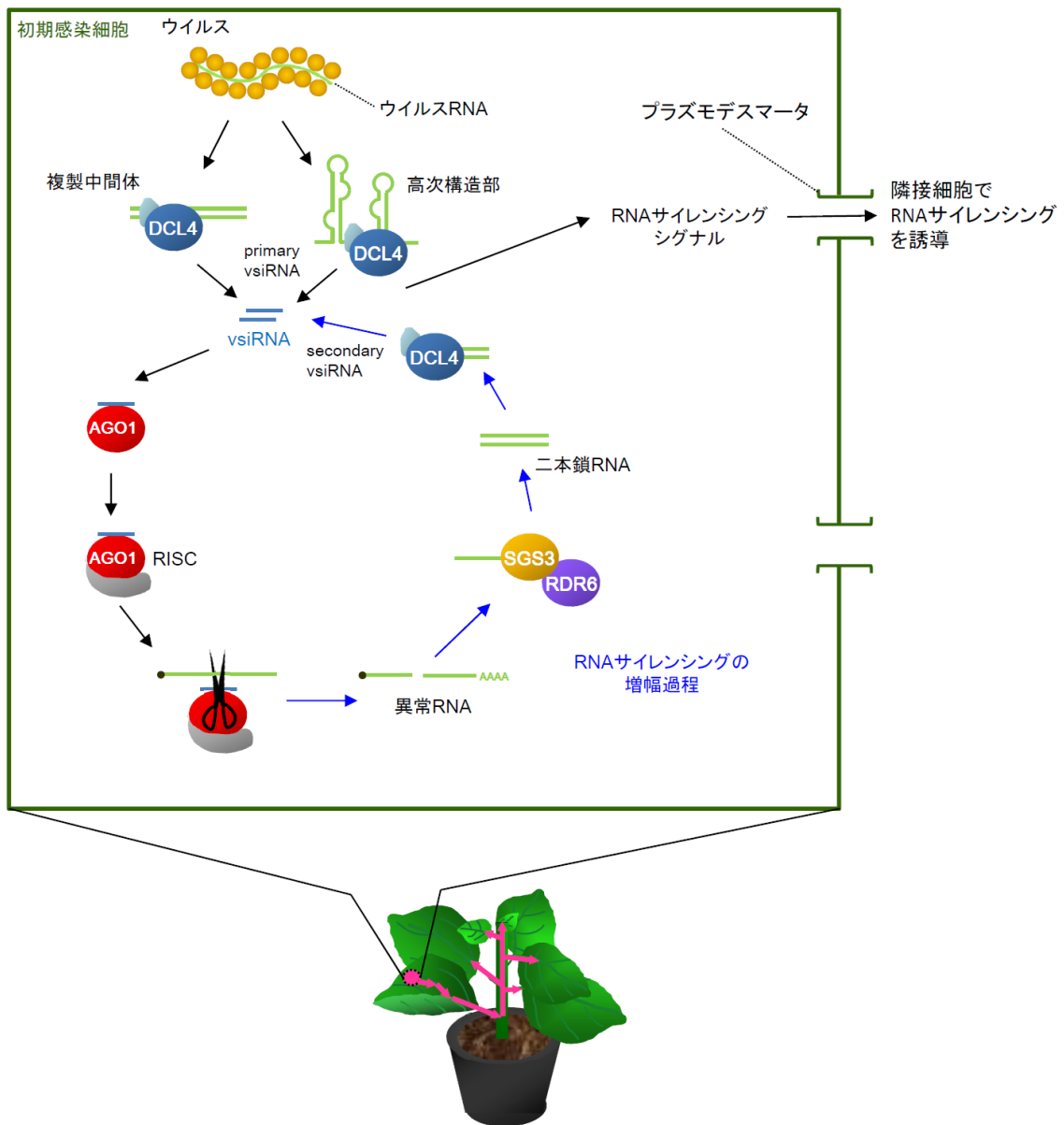


図3.1 植物が備えているウイルス防御機構としてのRNAサイレンシングの模式図

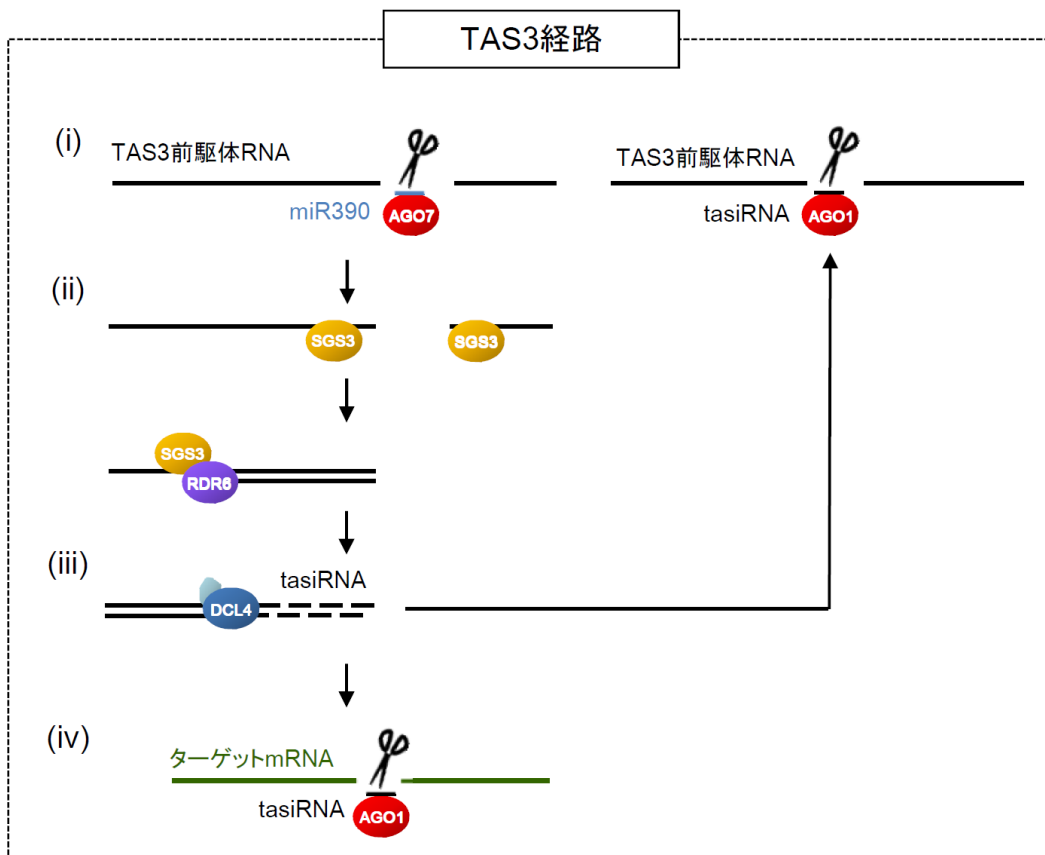
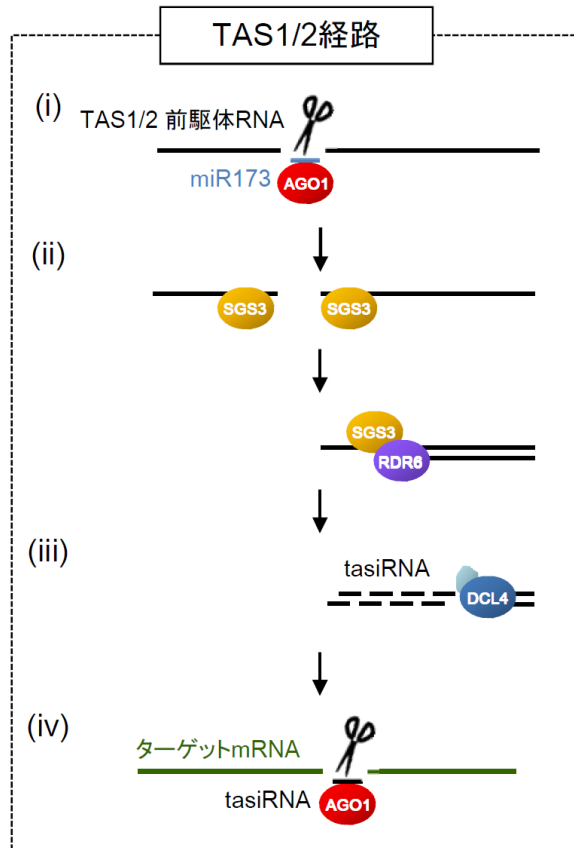
青色の矢印で示された過程は、RNAサイレンシングの増幅過程を示す。初期感染細胞（緑色の四角）で生成されたRNAサイレンシングシグナルはプラズモデスマータを介して隣接細胞へ移行し、隣接細胞でRNAサイレンシングを誘導する。このシグナルはさらに維管束を介して全身へ拡大し、全身でRNAサイレンシングを誘導する（下のピンクの矢印）。



は、キュウリモザイクウイルス (cucumber mosaic virus, CMV) の蓄積量が大幅に増加することから、RNA サイレンシング増幅の過程はウイルス防御において重要であると考えられている (Wang et al., 2011)。

さらに、初期細胞で誘導・増幅されたRNA サイレンシングは、植物体全身に拡大する (Voinnet and Baulcombe, 1997; Voinnet et al., 1998)。RNAサイレンシングの全身拡大は、初期細胞において生成された、実態不明のシグナルが、プラズモデスマータを通して隣接細胞へ移行し、さらには維管束篩部内を通して植物体全身に拡大する過程である。ウイルスの初期感染細胞内で生成されたシグナルはウイルスの全身感染に先立って全身組織に移行し、遅れて移行してきたウイルスに対して直ちにRNA サイレンシングを誘導することでウイルスの感染拡大を阻害すると考えられている (Schwach et al., 2005)。また、シグナルの全身組織への移行にはRDR6 が必要であることから、未感染の全身組織へのシグナルの移行にはRNAサイレンシングの増幅過程が関与していると考えられる (Himber et al., 2003; Schwach et al., 2005)。

一方で、ウイルス防御機構としての機能に加え、植物においてRNAサイレンシングは、形態形成、ゲノム安定性、環境ストレス応答など、生存過程で必須の役割を果たしている。この過程は、microRNA (miRNA)、*trans-acting* siRNA (tasiRNA)、natural antisense siRNA (nat-siRNA) のような内在性の21-24塩基のsRNAを介して調節されている。miRNAはmiRNA 遺伝子の長い転写産物が形成する、不完全なステムループ部分から切り出されることによって生成される (Bartel, 2004)。tasiRNAは、TAS 遺伝子と呼ばれるゲノム上のノンコーディング領域から転写された前駆体RNAが、AGO1/miRNAまたはAGO7/miRNA複合体による切断等の過程を経て生成されるsiRNAである (図3.2)。AGO1/miRNAまたはAGO7/miRNA複合体により切断されて生じたTAS前駆体RNA断片は、SGS3と結合して安定化し、これを鋳型としてRDR6 によって相補鎖が合成される (Peragine et al., 2004)。合成された二本鎖RNA はDCL4 に認識され、21 塩基のtasiRNA が切り出される (Nakazawa et al., 2007)。生成されたtasiRNA は、AGO1 と結合してRISC を形成し、相補的な配列をもつターゲット mRNAを切断する。現在、tasiRNA 経路はシロイヌナズナで4 種類 (TAS1-4) が知られており、そのうちTAS1、2、3 で関与する因子が詳細に解析されている (Allen et al., 2005; Luo et al., 2011; Rajagopalan et al., 2006)。TAS1 およびTAS2ではmiR173 とAGO1 から成るRISC によって前駆体RNA が切断され、生じたtasiRNA は少なくとも6つ以上のpentatricopeptide repeat (PPR) 遺伝子をターゲットとする (Allen et al., 2005; Howell et al., 2007; Montgomery et al., 2008b; Yoshikawa et al., 2005)。一方でTAS3 はmiR390 とAGO7 から成るRISC によって前駆体RNAが切断され、生じたtasiRNA はauxin response factor 2, 3, 4 (ARF2, 3, 4) 遺伝子およびTAS3前駆体RNA をターゲットとする (Adenot et al., 2006; Fahlgren et al., 2006; Garcia et al., 2006; Montgomery et al., 2008a)。以上のように、ウイルスに対するRNAサイレンシング経路とtasiRNA経路は完全に独立した経路ではなく、RDR6, SGS3, DCL4等の共通した因子が関わっている。



### 図3.2 *trans*-acting siRNA (tasiRNA) 経路

tasiRNA経路では、(i) TAS前駆体RNAがmiRNA/AGO複合体によって切断され、(ii) 切断断片がSGS3と結合して安定化され、それを鋳型にRDR6を二本鎖RNAが合成し、(iii) この二本鎖RNAからDCL4によってtasiRNAが切り出され、(iv) tasiRNAがAGO1と結合してRISCを形成し、相補配列を持つターゲット遺伝子のmRNAを切断する、という段階からなる。現在、4つのTASファミリーが存在しており、TAS1-3に関与する因子が明らかとなっている。TAS1と2ではmiRNA173によって前駆体RNAが切断され、ターゲットはpentatricopeptide repeat protein (PPR) 遺伝子である。TAS3ではmiRNA390によって前駆体RNAが切断され、auxin response factor (ARF) 遺伝子および前駆体RNAがターゲットとなっている。

---

## 1.2 植物ウイルスにコードされる RNA サイレンシングサブプレッサー

植物ウイルスの多くは宿主のRNAサイレンシングに対抗するため、RNAサイレンシング抑制タンパク質（サブプレッサー）を持つ。多くの植物ウイルスでサブプレッサーに変異を導入した場合に、ウイルス蓄積量の減少や病徴の軽減、感染性の喪失が起きることが報告されていることから、宿主植物のRNAサイレンシングを抑制することはウイルスが感染を成立させるにあたって重要なプロセスであると考えられる（Csorba et al., 2009; Li and Ding, 2006; Silhavy and Burgyán, 2004）。サブプレッサーの作用機構については、すでいくつかのウイルスで詳細に明らかにされている。これまでに作用機構が明らかにされたサブプレッサーは、それぞれRNAサイレンシングの様々な段階を抑制するが、多くのサブプレッサーに共通した作用点はsiRNAとの結合およびAGO1との結合である。例えば、*Tombusvirus*属ウイルスのサブプレッサーp19は21塩基の二本鎖siRNAと結合し、siRNAのRISCへの取り込みを阻害する（Vargason et al., 2003; Ye et al., 2003）。この他にもsiRNAと結合するサブプレッサーは多数報告されている（Lakatos et al., 2006; Merai et al., 2006）。また、sweet potato mild mottle virusのP1とturnip crinkle virusのp38はGW/WGモチーフを介してAGO1と結合することで、RISC形成を阻害する（Azevedo et al., 2010; Giner et al., 2010）。一方で、CMVの2bは、AGO1のPAZおよびPIWIドメインと結合して、*in vitro*においてAGO1のRNAスライサー活性を阻害する（Zhang et al., 2006）。このほか、beet western yellows virusのP0やcymbidium ringspot virusのp19は、AGO1の蓄積量を低下させることが知られている（Baumberger et al., 2007; Bortolamiol et al., 2007; Várallyay et al., 2010）。現在のところ、上述のようにサブプレッサーとsiRNAとの結合あるいはAGO1との結合は、多くのウイルスに共通したRNAサイレンシング抑制機構であり、siRNA結合時の立体構造が明らかにされるなど詳細な解析がなされている。他方で、RDR6やSGS3等が関与するRNAサイレンシング増幅の過程は、ウイルスに対する防御に重要であることから、サブプレッサーによるRNAサイレンシング阻害の格好のターゲットとなりうる。しかしながら、RNAサイレンシング増幅の過程に関わる因子をターゲットとする

サプレッサーはこれまでに3例報告されているのみである。*Tenuivirus*属ウイルスのrice stripe virusが持つp2および*Rhabdovirus*属ウイルスのrice yellow stunt virusが持つp6は、それぞれSGS3、RDR6と相互作用をする (Du et al., 2011; Guo et al., 2013)。*Geminivirus*属ウイルスのtomato yellow leaf curl virusの持つV2も、SGS3と結合し、細胞内で共局在する (Glick et al., 2008)。しかしながら、他の研究では、V2は二本鎖RNAと結合し、SGS3が自らの基質である二本鎖RNAに結合するのを妨げると報告されている (Fukunaga and Doudona, 2009)。したがって、これらのサプレッサーは二本鎖RNA合成を阻害する可能性はあるが、その機能に関する生物学的解析は限られている。

siRNAやAGO1をターゲットとするサプレッサーは、植物の形態形成に関わるmiRNAやtasiRNAなど植物内在性のRNAサイレンシングにも副次的に作用することが報告されている (Chapman et al., 2004; Chen et al., 2004; Dunoyer et al., 2004; Kasschau et al., 2003; Moissiard et al., 2007; Zhang et al., 2006)。たとえば、*Tombusvirus*属のp19 などウイルス由来のsiRNAと結合するサプレッサーは、miRNAやtasiRNAとも結合し、RISCの形成を阻害する (Chapman et al., 2004; Dunoyer et al., 2004; Kasschau et al., 2003; Moissiard et al., 2007)。また、CMVの2bなどAGO1の活性を阻害するサプレッサーは、miRNAやtasiRNAのターゲット遺伝子のmRNA量を増加させる (Chapman et al., 2004; Moissiard et al., 2007; Zhang et al., 2006)。このような結果と一致して、ウイルスのサプレッサー遺伝子を導入した植物ではしばしば形態異常を生じることがある。したがって、植物がウイルス感染の際に示す萎縮、叢生、縮葉、巻葉といった形態異常を伴う病徴が、ウイルスのサプレッサーによる植物内在性RNAサイレンシング経路の攪乱により生じることがあると考えられている (Culver and Padmanabhan, 2007)。

### 1.3 *Potexvirus* 属ウイルスにコードされるサプレッサー

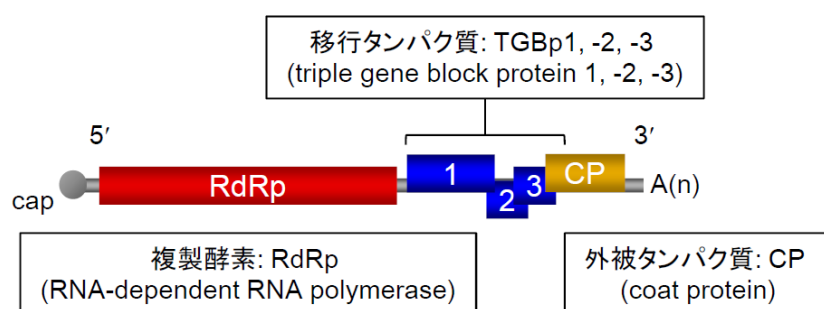


図3.3 plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) のゲノム構造

*Alphaflexivirus*科*Potexvirus*属のタイプ種であるpotato virus X (PVX) のTGBp1は、*Tombusvirus*属ウイルスのp19や*Potyvirus*属ウイルスのHC-Proとほぼ同時期に発見され、代表的なサプレッサーの1つとして様々な解析に用いられてきた。しかし、これまでのところTGBp1によるRNAサイレンシング阻害の詳細は明らかになっていない。この原因として、PVXのTGBp1のサプレッサー能が弱いことが挙げられる。実際に、PVXは当初サイレンシング抑制能を示さなかったことから、サプレッサーを持たないウイルスであると考えられていた (Brigeneti et al., 1998; Voinnet et al., 1999)。しかしながら、後の詳細な解析で、PVXのTGBp1が、RNAサイレンシングの誘導因子が導入された初期細胞におけるRNAサイレンシングに対する抑制能および、RNAサイレンシングシグナルの全身拡大に対する抑制能を持つことが明らかになった (Bayne et al., 2005; Voinnet et al., 2000)。しかし、p19や*Potexvirus*属の他種ウイルスのTGBp1と比べるとPVX-TGBp1のサプレッサー能は弱いことが知られている (Senshu et al., 2009)。

本研究では*Potexvirus*属の*plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) を用いた。PIAMVの宿主範囲は広く、自然界において双子葉植物 (オオバコ)、単子葉植物 (ユリ)、木本植物 (ナンテン) への感染が報告されている。タバコ属植物の*N. benthamiana*には、壊死および葉の奇形等の病徴を誘導する。PIAMVはこれまでにロシア (Solovyev et al., 1994)、日本 (Komatsu et al., 2008)、アメリカ (Hughes et al., 2005) でその発生が報告され、いくつかの分離株の全塩基配列が決定されている。そのゲノムは全長約6.1 kbのプラス一本鎖RNAであり、5'末端には他の同属ウイルスと同様にキャップ構造が付加されていると考えられ (Sonenberg et al., 1978)、また3'末端にはpoly (A) tailが付加している (Morozov et al., 1983) (図3.3)。PIAMVのゲノムRNAには5つのOpen Reading Frame (ORF) が存在する。同属ウイルスとのアミノ酸配列の相同性に基づき、ORF1はRdRpをコードしていると推定されており、実際にこのタンパク質だけで複製には十分である (Komatsu et al., 2011)。ORF2, 3, 4はtriple gene block proteinと呼ばれる移行タンパク質 (それぞれTGBp1, TGBp2, TGBp3) をコードしている。ORF5は、外被タンパク質 (coat protein; CP) をコードしており、そのN末端領域はウイルスの細胞間移行に必要である (Ozeki et al., 2009)。他の*Potexvirus*属ウイルスと同様、ORF1にコードされるRdRpはゲノムRNAから直接翻訳されると考えられている。一方で、ORF4以外の下流のORFにコードされる各タンパク質は、各ORFの上流に存在するサブゲノムRNAプロモーターによって転写調節されるサブゲノムRNAを介して翻訳される。ORF4にコードされるTGBp2はORF3にコードされるTGBp1と同じサブゲノムRNAから、TGBp1の開始コドンの読み過ぎ (リーキースキャニング) によって翻訳される (Verchot-Lubicz et al., 2007)。これらのうちTGBp1は、PVX-TGBp1などを含む*Potexvirus*属ウイルスにコードされるTGBp1のなかで、最も高いRNAサイレンシング抑制活性を持つものの1つである (Senshu et al., 2009)。

そこで本研究では、*Potexvirus*属ウイルスのなかで強いRNAサイレンシング抑制能を示すPIAMVのTGBp1を用いて解析を行うことで、TGBp1のRNAサイレンシング抑制メカニズムおよびウイルス感染において果たす役割を明らかにすることを試みた。本研究では、

PIAMV-TGBp1形質転換シロイヌナズナを用いた解析により、PIAMVのTGBp1がtasiRNA経路中の、RDR6およびSGS3が関与するTAS前駆体RNAの二本鎖RNA合成の段階を阻害することを明らかにした。さらに、ウイルス感染におけるTGBp1の機能を解析するため、SGS3ならびにRDR6によりウイルス蓄積量が抑制される変異CMVの接種試験を行ったところ、TGBp1形質転換体では野生型植物に比べて変異CMVの蓄積量が大きく増加した。このことから、TGBp1はSGS3ならびにRDR6の機能阻害を介して、ウイルスに対するRNAサイレンシングを抑制することにより、ウイルスの増殖を促進することが示唆された。

## 2. 材料および方法

### 2.1 供試植物

本研究では、供試植物としてシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、*Nicotiana benthamiana* を用いた。シロイヌナズナの野生型 エコタイプ Columbia (Col-0)ならびにLandsberg erecta (Ler)、および各種形質転換体、ならびに変異体は、光照射下15 時間、暗黒下9 時間 (いずれも23°C設定) に設定した人工気象室において生育させた。本研究で用いたシロイヌナズナの変異体は、*sgs3-11* (CS24289)、*rdr6-11* (CS24285)、*dcl4-2e* (CS6954)、*zip-1* (AGO7遺伝子の変異体、CS24281)、*dcl1-9* (CS3828) であり、全てArabidopsis Biological Resource Center (ABRC) より分譲を受けた。*N. benthamiana*については、光照射下 (25°C) 15 時間、暗黒下 (20°C) 9 時間に設定した人工気象室において生育させた。

### 2.2 供試ウイルスおよび接種法

供試ウイルスとして、青森県福地村においてモザイク症状を呈した1個体のサクラソウ (*Primula sieboldii*) より単離された、PIAMV のPr分離株を用いた。

2b遺伝子を欠損したCMV (CMV- $\Delta$ 2b) のシロイヌナズナへの接種は、以下の手順に従って機械接種により行った。まず、CMV-Y系統の3つの分節ゲノム (RNA1-3; 図3.4) を35Sプロモーターの下流に挿入した感染性cDNAクローンpUC35STR1, pUC35STR2, pUC35STR3 (東京大学鈴木匡博士より分譲いただいた) のうち、pUC35STR2にコードされる2b遺伝子の開始コドンに変異を導入し、pUC35STR2mを構築した (構築方法は2.3項参照)。pUC35STR1、pUC35STR2m、pUC35STR3のそれぞれ5 $\mu$ gずつをNotIおよびSphIで制限酵素処理し、フェノールクロロホルム抽出した後、エタノール沈殿を行い精製した。これにより、35SプロモーターとCMVの各分節ゲノム由来のcDNA全長がプラスミド中から切り出される。続いて、3種類のcDNA溶液を混合し、それぞれを700 ngずつ含む10  $\mu$ lの溶液を調製した。*N. benthamiana*の葉にカーボランダム (400~600メッシュ) をふりかけた後、調製したcDNA溶



液を葉面に乗せ、ゴム手袋をした指で軽くなでつけることで機械接種を行った。直後に接種葉に水道水をかけ、カーボランダムを洗い流した。接種後13日に、*N. benthamiana*の接種葉を採取し、葉100 mgあたり3 mlの0.1Mリン酸バッファー (pH7.0) とミクロスパーテル約1杯分のdithiothreitolを加えて乳鉢の中ですりつぶし、これをシロイヌナズナへの機械接種用の接種源としてエッペンチューブに分注して-80°Cで保存した。

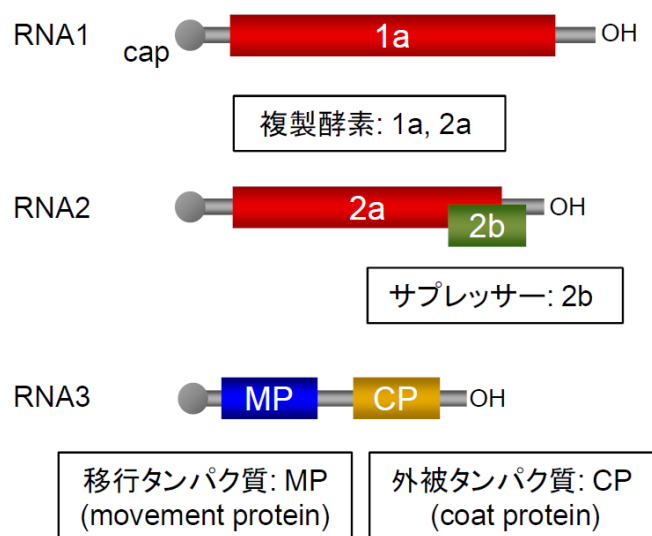


図3.4 cucumber mosaic virus (CMV) のゲノム構造

### 2.3 ベクター構築

本研究で用いたベクターの作製法を以下に述べる。なお、本章で用いた全プライマー配列一覧を表 3.1 に示す。構築したベクターの確認は、シーケンスにより塩基配列を解読することで行った。2b タンパク質を発現しない CMV の感染性クローンを構築するため、以下のように pUC35STR2 の 2b 遺伝子の開始コドンに変異を導入した。概要は図 3.5 に示した。まず pUC35STR2 をテンプレートに、フォワードプライマーCMV2-1610-F およびリバースプライマー-d2b-R を用いて KOD -Plus- Neo (TOYOBO) により PCR を行い、2a 遺伝子の途中から 2b 遺伝子の開始コドン付近までの領域の DNA 断片 A を増幅した。同様に、pUC35STR2 をテンプレートに、フォワードプライマー-d2b-F およびリバースプライマーCMV2-2683-R を用いて KOD -Plus- Neo により PCR を行い、2b 遺伝子の開始コドン付近から 2b 遺伝子の途中までの領域の DNA 断片 B を増幅した。この際に、2b 遺伝子の ORF の 5'末端領域に同

一フレームで存在する3つのAUGコドン (RNA2の2420-2422番目、2441-2443番目、2471-2473番目の塩基) をすべてACGコドンに置換した。これらのDNA断片の混合物をテンプレートとして、フォワードプライマーCMV2-1610-FおよびリバースプライマーCMV2-2683-Rを用いてリコンビナントPCRを行った。また、それとは別に、pUC35STR2をテンプレートに、フォワードプライマーCMV2-2664-FおよびリバースプライマーCMV2-1627-Rを用いてKOD-Plus-NeoによりPCRを行い、2b遺伝子の途中からベクター配列を含んで2a遺伝子の途中にわたる領域を増幅した。これらのDNA断片を用いて、GeneArt Seamless Cloning and Assembly kit (Invitrogen) により相同組換えを行い、2b遺伝子欠損CMV感染性クローンpUC35STR2mを得た。

表 3.1 第 3 章で用いたプライマー

プライマー	塩基配列 (5' to 3')
CMV2-1610-F	TCAAAAACAAACACTGCCTCG
d2b-R	GACGTTTGTCGTTGCACCTACGTTCAATTCCGTATTTCTTTTCG
d2b-F	GTAGGTGCAACGACAAACGTCGAACTCCAACCTGGCTCGTACGGTGGAGG
CMV2-2683-R	CGATAACTCTAAACGAGAGGCCTC
CMV2-2664-F	CCTCTCGTTTAGAGTTATCG
CMV2-1627-R	GGCAGTGTGTTGTTTTGACATC

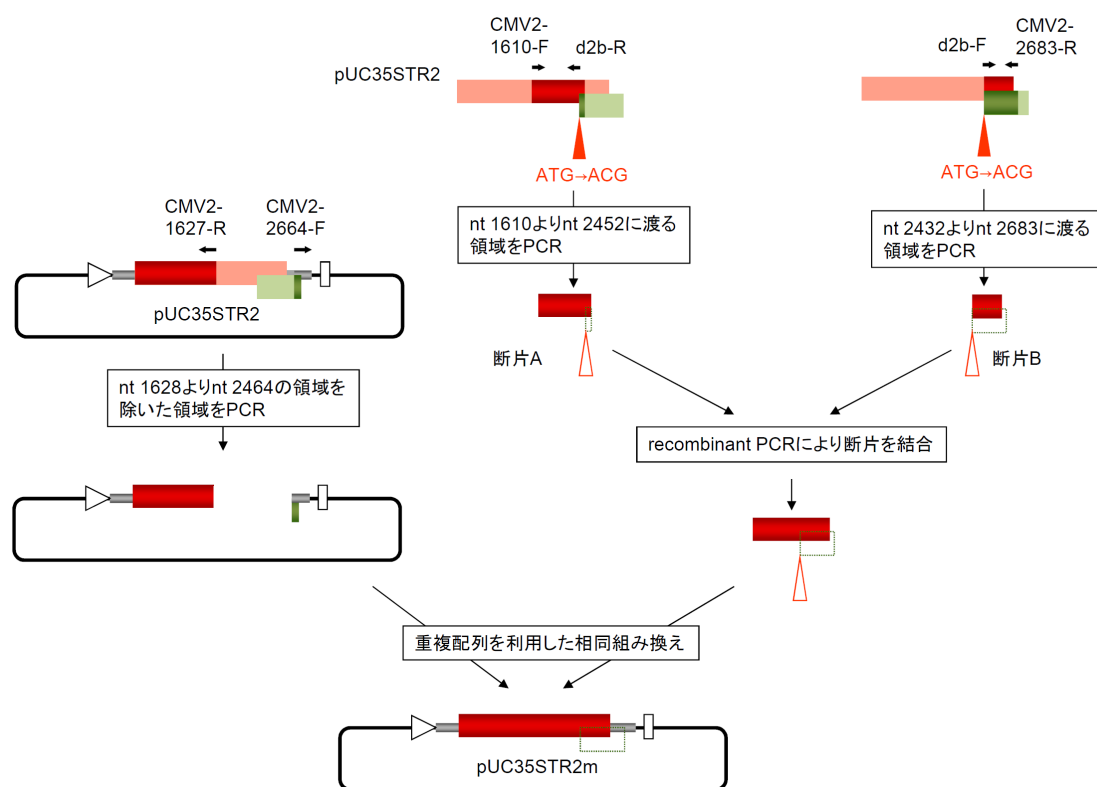


図 3.5 pUC35STR2m の構築

赤色のバーは2a遺伝子、緑色のバーは2b遺伝子、白色の三角形はCaMVの35Sプロモーター、白色の四角はnopaline synthase (Nos) ターミネーターを示す。

## 2.4 ノーザンブロット解析

シロイヌナズナにおけるTAS 前駆体RNA の検出は、ノーザンブロット解析により行った。まず、開花後のシロイヌナズナの全組織からISOGEN (ニッポンジーン) を用いて、添付のプロトコルに従って全RNA を抽出した。抽出した全RNA を200  $\mu$ l のRNase free の水に溶解し、200  $\mu$ l の8 M LiCl を加えて攪拌した後、氷中で1 時間静置した。19,000 $\times$ g で30 分間遠心し、沈殿を高分子画分、上清を低分子画分とした。低分子画分は、1mlの100% エタノールを加えて19,000 $\times$ g で30 分間遠心し、上清を除いて乾燥後、RNase freeの水に溶解した。全RNA、低分子画分ともに、分光光度計によって260 nm における吸光度を測定し、RNA 濃度を決定した。

TAS2前駆体RNA の検出には、1 サンプルあたり20  $\mu$ g の全RNA を使用し、泳動にはホルムアルデヒド変性1.2%アガロースゲルを用いた。RNA 泳動量のコントロールとして、泳動後にエチジウムブロマイド染色を行い、UV 照射下での低分子画分RNA (5S rRNA, tRNA) および25S rRNAの染色像を指標に、各サンプル間でRNA 量が揃っていることを確認した。その後、泳動したRNA をトランスブロットSD セル (Bio-Rad) を用いてNyron Membrane, positively charged (Roche Diagnostics) に転写し、UV クロスリンクによってメンブレンに固定した。RNA の検出には、ノンラジオアクティブなラベリングであるDigoxigenin (DIG) システム (Roche Diagnostic) を用いた。ブロッティング後のメンブレンを2 $\times$ SSC (300 mM NaCl, 30 mM C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O, pH 7.4) を用いて洗浄し、DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics) でプレハイブリダイゼーションを行った。その後、DIG ラベルしたRNA プローブを、TAS 3,000倍希釈し、65 $^{\circ}$ Cで12時間、それぞれハイブリダイゼーションさせた。次いで、メンブレンを洗浄液1 (2 $\times$ SSC, 0.1 % SDS) および洗浄液2 (0.2 $\times$ SSC, 0.1 % SDS) を用いて洗浄し、DIG Wash and Block Buffer Set (Roche Diagnostics) のブロッキングバッファーでブロッキング後、Anti-Digoxigenin-Fab fragment 抗体を10,000 倍希釈したものを室温で1 時間反応させた。Washバッファーで洗浄した後、CDP-star (New England Biolabs) を用いて検出した。CDP-star を用いた化学発光の検出にはLAS-1000 (Fujifilm) を使用した。TAS2前駆体RNAの検出に用いたRNAプローブは、TAS2 遺伝子 (At2g39681) の部分配列 (nt 180-767)をpGEM-T Easy (Promega) にクローニングしたベクターをそれぞれSpeI 処理によって直鎖化し、T7 ポリメラーゼとDIG Northern Starter Kit (Roche Applied Science) を用いて*in vitro* 転写を行うことによって作製した。

また、シロイヌナズナにおけるCMV- $\Delta$ 2bのウイルスRNA蓄積量の解析では、以下の手順に従った。CMV- $\Delta$ 2b接種後13日のシロイヌナズナの地上部から、ISOGENを用いて、添付のプロトコルに従って全RNA を抽出した。1サンプルあたり1  $\mu$ gの全RNAを使用し、ホルムアルデヒド変性1%アガロースゲルを用い、50 V で160 分間電気泳動を行った。RNA 泳動量のコントロールとして、泳動後にエチジウムブロマイド染色を行い、UV 照射下でのrRNA

の染色像を指標に、各サンプル間でRNA量が揃っていることを確認した。その後のプロットティングから検出までは、上記のTAS前駆体RNAの相補鎖の検出と同様に行った。但し検出に用いたRNAプローブは、以下の手順で作製した。pUC35STR2をテンプレートに、CMVのRNA2の3'末端の240塩基の領域に相当するDNA断片をPCRによって増幅し、5'末端にはT7プロモーターを付加するようにした。その増幅産物を鋳型として、DIG Oligonucleotide Labeling Kit (Roche Diagnostics) を用いて*in vitro* 転写を行った。CMVのRNA1-3は、3'末端240塩基の相同性が非常に高いため、このプローブによって3本のゲノムRNAおよびRNA3から転写されるサブゲノムRNAであるRNA4がすべて検出できる。プローブのハイブリダイゼーションには、 $1.4 \times 10^4$ 倍希釈して用い、ハイブリダイゼーション温度は68°Cとした。

## 2.5 RNase protection assay

TGBp1形質転換体において二本鎖RNAの蓄積量を解析するため、RNase protection assayを行った。まず、開花後の*A. thaliana* 全組織から全RNAを抽出し、RNase-free Recombinant DNase I (TaKaRa) で処理した。そのRNA 5 µg にRNase ONE Ribonuclease (Promega) を0、1、5 unit 加え、37°Cで1時間インキュベートした。RNase処理したRNAを鋳型として、Random Primer (N)9 (TaKaRa) を用いて、Cloned AMV Reverse Transcriptase (Invitrogen) による逆転写反応を行った。反応時間は、25°C 10分、42°C 60分、85°C 5分で行った。さらに、逆転写反応産物2.5 µl を鋳型として、TAS2遺伝子特異的プライマーセット(TAS2-450F と TAS2-570R) またはTAS3遺伝子特異的プライマーセット (TAS3-704FとTAS3-841R) を用いて、KOD-Plus-Neo (TOYOBO) によるPCRを行った。反応時間は、94°C 2分、(94°C 15秒、55°C 30秒、68°C 12秒) を1サイクルとして35サイクル、68°C 7分で行った。反応終了後、3%アガロースゲルにより電気泳動を行い、泳動後にエチジウムブロマイド染色によってDNA断片の増幅を確認した。



## 2.6 小分子RNA ライブラリーの作製と大規模シーケンス

小分子RNA (sRNA) ライブラリーの作製および大規模シーケンスは、RNA抽出以降の工程をタカラバイオ株式会社に委託し行った。以下、タカラバイオ株式会社からの報告に基づき、手順を記す。sRNAライブラリーの作製はマニュアルSmall RNA v1.5 Sample Preparation Guide Rev. C (イルミナ) に従い、SmRNA Sample Prep Kit (イルミナ) を用いて行った。具体的には、まず開花後のシロイヌナズナの全組織からISOGEN (ニッポンジーン) を用いて、添付のプロトコルに従って全RNA を抽出した。5 µgの全RNAを、15%ポリアクリルアミドウレア変性ゲルを用いた電気泳動により分離し、18–30塩基のサイズに相当するRNAを選別した。続いてsRNAの3'末端にT4 RNA ligase 2, truncated (NEB) を用いて24塩基長のアデニル化アダプターを連結した後、5'末端に、ATP (TaKaRa) およびT4 RNA ligase 1 (イルミナ) を用いて55塩基長のタグ付アダプターを付加した。このタグ付アダプターには、読み取り塩基の配列の始めの6塩基にタグ配列が出現するようになっており、サンプルごとにタグ配列を変えることで、配列がどのサンプルに由来するかを識別することが可能となっている。次に、3'末端側のアダプターを認識するプライマーを用いた転写反応により、一本鎖cRNAを合成した。この一本鎖cRNAをテンプレートとし、PCRによる増幅を12サイクル行った。得られたPCR産物を、6%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により分離し、sRNAとアダプターを合わせた塩基長に相当する約100bpの画分を回収し、タグ付DNAライブラリーとした。このタグ付DNAライブラリーについては、Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer (アジレントテクノロジー) を用いて品質の評価を行った。タグ付DNAライブラリーはTGBp1形質転換体およびGUS形質転換体由来のサンプルを混合したものをシーケンスに用いた。

次に、作製したDNAライブラリーを鋳型として、Cluster StationおよびCluster Generation Kit (イルミナ) を用いて、クラスター形成を行った。イルミナ社のGenome Analyzer IIxとSequencing Kitを用いて、クラスターを形成する鋳型DNAの塩基配列を決定した。

## 2.7 シーケンスデータ解析

大規模シーケンスにより得られたsRNA配列情報のデータ解析は、タカラバイオ株式会社および株式会社メイズに委託し行った。以下、両社からの報告に基づき、手順を記す。

### 2.7.1 タグ分類とフィルタリング

シーケンスデータの解析には、Genome Analyzer IIx付属のソフトウェア [Sequencing Control Software (SCS) v2.8、Real Time Analysis (RTA) v1.8、BCL converter v1.7.1、Off-Line Basecaller Software (OLB) v1.8、Consensus Assessment of Sequence And Variation (CASAVA) v1.7] を用いてベースコールを行い、fastqファイルを出力した。次に、得られた読み取り配

列 (リード配列) を、先頭に付与されているタグによってサンプル識別し、分類を行った。続いて、リード配列に含まれるアダプター配列のトリミングと、トリミングした解析配列の長さが極端に低いものを除去した。このフィルタリングの具体的な手順は以下の通りである。sRNA配列は5'末端から75塩基シーケンスされるため、3'アダプターは読み取り配列に必然的に含まれてしまう。また、5'アダプターをクローニングしてしまう場合もある。そこで、本工程ではソフトウェアを用いてアダプター配列を検出し、アダプター部分の配列のトリミングを行った。ソフトウェアとしては、Paracel Transcript Asembler (Paracel) に含まれるペアワイズアライメント用のツールであるscoutを用いた。scoutはHASTEと呼ばれるアルゴリズムを使用しており、今回HASTEで用いたパラメーターは以下の通りとした。この条件では、リードとアダプターの配列が12塩基以上一致すれば、アダプターが検出されたことになる。

#### ● Score Matrix

- > matched with itself: +2
- >miss matched: -3
- >gap open: -5
- >gap extension: -5

#### ● Threshold: 24

このようにして検出されたアダプター配列を、種類とリード上の位置関係に基づき、以下のトリム処理を行った。

- ① 5'アダプターが検出された場合、そのリードを削除する (5'アダプターを誤ってクローニングしたクローンの除去)
- ② 3'アダプターの6塩基目以降だけが検出されている場合、このアダプター検出を無視する (偶然3'アダプター配列と似た配列がペアワイズアライメントされてしまった場合と考えられ、トリムを行うと本当はsRNA配列だった領域が失われてしまう)
- ③ 3'アダプターが検出されたが、アダプターのトリム後の配列が16塩基以下になってしまう場合、そのリードを除去する (5'アダプターと3'アダプターが連結した分子由来の配列の除去)
- ④ ①-③に該当せず、3'アダプターが検出されている場合、3'アダプター配列の除去を行う
- ⑤ 5'アダプターおよび3'アダプターが共に検出されなかった場合、この工程では処理を行わず、次の工程に用いる)

フィルタリング後、④においてトリムを行ったリード配列および⑤において処理が行わ

れなかった配列を以降の解析を行った。

## 2.7.2 ゲノムへのマッピング

前工程でフィルタリングをした配列を、ソフトウェアBowtie (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>) によって、データベースensemblに登録されているシロイヌナズナのゲノム配列へのアライメントを行った。アライメントできなかったリードに対しては、3'末端を1塩基トリムし、再度アライメントを行った。この処理を、個々のリード配列が17塩基以下になるまで繰り返し行った (図3.8)。16塩基以下になってもアライメントされなかったリードは以降の解析には用いないこととした。

Bowtieを実行する際に、「-v 1 -all -m 30 -best -strata」のパラメーター設定で行った。この設定では1塩基のミスマッチを許容してアライメントを行い、全てのアライメントの中から最もミスマッチ数が少ないものを結果として出力する。例えば、完全一致のアライメントは、1塩基ミスマッチのアライメントに対し優先される。また、検出箇所が30か所以上あったリード配列はマッピング不可能として対象から除く。アライメントの結果、あるリードがゲノム配列のある位置のみにヒットした場合、ユニークヒットと分類される。一方、あるリード配列がゲノムの複数位置に同順位でアライメントされた場合、マルチヒットと分類される。また、3'末端のトリムを行う際には「-trim」のパラメーターを用いた。

1回目のアライメント(トリミングなし)

リード1: 1塩基ミスマッチでマッピング  
リード2: 2塩基ミスマッチでマッピング不可  
リード3: 3塩基ミスマッチでマッピング不可

リード1 AACATAGATGAAATTTTCACGT
リード2 AACATAGAGGAAATTTTCACGTAG
リード3 AACATAGATGAAATTTTCACGTAG



2回目のアライメント(トリミング1塩基)

リード2: 1塩基ミスマッチでマッピング  
リード3: 2塩基ミスマッチでマッピング不可

リード2 AACATAGAGGAAATTTTCACGTAG
リード3 AACATAGATGAAATTTTCACGTAG



3回目のアライメント(トリミング2塩基)

リード3: 1塩基ミスマッチでマッピング

リード3 AACATAGATGAAATTTTCACGTAG
----------------------------------

図3.6 ゲノムへのマッピングのイメージ図

リードの黒字は配列にヒットした塩基、赤字はミスマッチの塩基を表す。ミスマッチが2塩基以上ある場合は、リードの3'末端の1塩基をトリミングして再びマッピングを行い、この作業を各リードが16塩基以下になるまで行った。

### 2.7.3 アノテーション

マッピングによって決定したリード配列のゲノム位置と、既知のsRNAをコードするゲノム位置を比較することにより、リード配列がどのsRNAに由来するかを決定した。あるリード配列がゲノム上にマッピングされた位置領域に対して、1塩基以上の重なりを持つ既知sRNAを、そのリード配列のアノテーションとした。比較に用いたデータベースおよびアノ

アノテーションの種類は表3.2に示す。miRBaseに登録されているmiRNAに関連する配列との比較については、miRNA前駆体RNAのステムループを形成する部分の推定配列 (miR stem-loop推定配列、miRNA\_hairpin) がmiRNA成熟配列 (miRNA\_mature) を含むことを考慮し、miRNAの成熟配列に対して比較を行った後、miRNA成熟配列に分類されなかったリード配列をmiR stem-loop推定配列に対して比較を行った。ここで「miRNA\_mature」は成熟配列とmiR\*配列 (stem-loop構造上で成熟配列と二本鎖を形成す低発現な配列) を含む。従って、あるリード配列がmiRNA\_hairpinとmiRNA\_matureに重複して分類はされない。データベースEnsemblとの比較に関しては、miRBaseとの比較とは独立して行った。

表3.2 sRNAのアノテーションの種類とアノテーションに用いたデータベース

アノテーションの種類	説明	データベース
miRNA_mature	miRNA成熟配列とmiRNA*	miRBase v16
miRNA_hairpin	miR stem-loop推定配列	miRBase v16
rRNA	ribosomal RNA	Ensemble Plants (release6)
tRNA	transfer RNA	Ensemble Plants (release6)
snRNA	small nuclear RNA	Ensemble Plants (release6)
snoRNA	small nucleolar RNA	Ensemble Plants (release6)
その他のRNA	—	Ensemble Plants (release6)

#### 2.7.4 発現量の計算

本解析では、発現量を示す指標として、RPKM (Reads per kilobase of exon model per million mapped reads) を用いた。アノテーション結果を基に、各sRNAのリード数およびRPKM値を計算した。本解析におけるRPKMは、正規化された各sRNAの発現量であり、以下の式で算出される。

(式1)

$$\text{RPKM} = \frac{10^9 \times \text{対象のsRNAにヒットしたリード数}}{\text{sRNAに分類されたリード数の総計} \times \text{対象のsRNAの塩基長}}$$

次に、各RPKMを求めるにあたり、リード配列をどのように分配したかを示す。アノテ



ションが行われたリードをそれぞれ、ユニークヒットとマルチヒットに分け、次のような手順で発現量の計算を行った。

- ① 各sRNAに関して、ユニークヒットのみをカウントする
- ② ①のリード数を基に、RPKM値を計算する
- ③ マルチヒットしたリードを、②のRPKM値の比率に基づき、各sRNAのリードに分配する
- ④ ①と③で求めたリード数を足し合わせて、sRNAの総リードとする
- ⑤ ④のリード数を基に、各sRNAのRPKMを再度計算する

図3.9のようにマルチヒットしたリードは、それぞれのsRNAに対してカウントされるが、上記の手順に従って分配を行った。青色のリードはRNA $\beta$ とRNA $\gamma$ のユニークヒットのRPKM比によって分配された。ユニークヒットがないRNAのRPKMは1と計算される。緑色のリードは、RNA $\alpha$ と $\beta$ と $\gamma$ のRPKM比によって分配された。RNA $\alpha$ にはユニークヒットのリード（赤色のリード）が存在するため、RNA $\beta$ とRNA $\gamma$ に比べて緑色のリードが多く分配される。

分類されたリード全配列および各sRNAの発現量は、DNA Data Base of Japan (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>) にアクセス番号DRA001183で登録した。

#### 2.7.5 既知 sRNA にヒットした配列の長さごとの頻度分布

既知のsRNAにヒットしたリード配列について、sRNAの長さごとにリード数の頻度分布を作成した。それを基に、(式1)に従ってリード数をRPKM値に換算した。

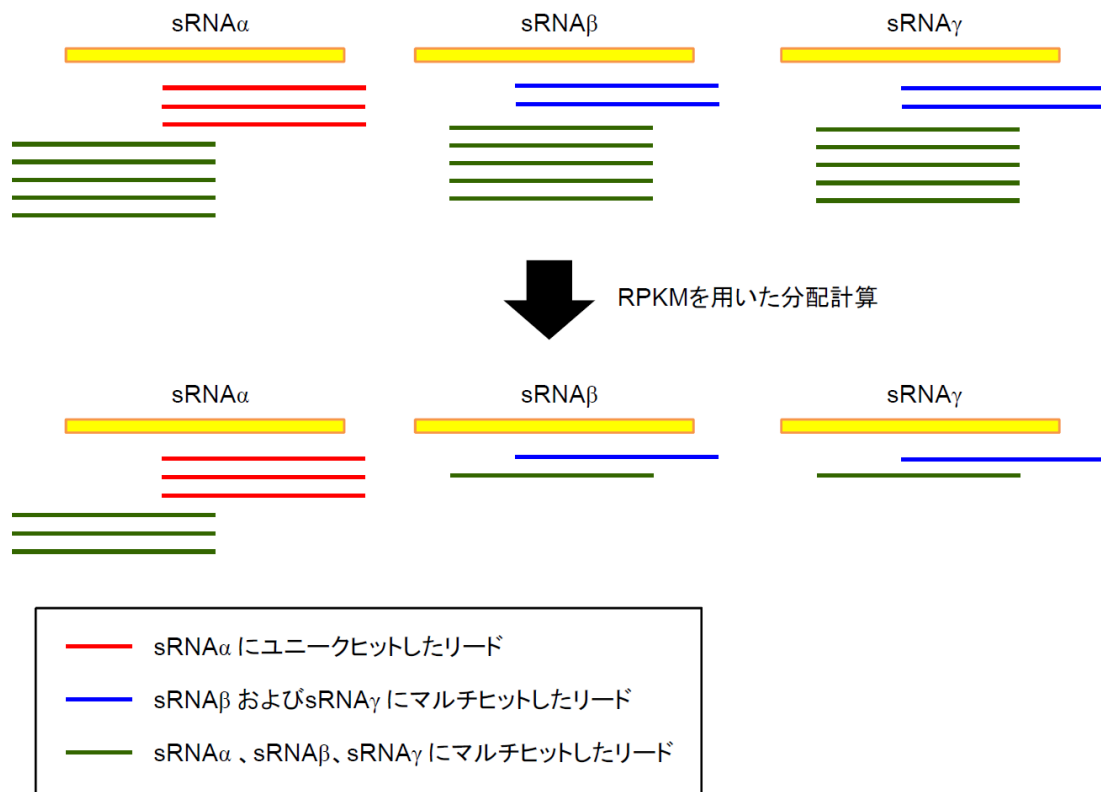


図3.7 ゲノムへマルチヒットしたリードの分配のイメージ

マルチヒットした青色のリードは $sRNA\beta$ と $sRNA\gamma$ のユニークヒットのRPKM比によって分配される。ユニークヒットがないRNAのRPKMは1と計算される。マルチヒットした緑色のリードは、 $sRNA\alpha$ と $\beta$ と $\gamma$ のRPKM比によって分配される。 $sRNA\alpha$ にはユニークヒットのリード(赤色のリード)が存在するため、 $sRNA\beta$ と $sRNA\gamma$ に比べて多くの緑色のリードが分配される。

### 3. 結果

#### 3.1 大規模シーケンスによる sRNA 発現量の網羅的解析

植物ウイルスのRNAサイレンシングサプレッサーの中には、TBSVのp19や、CMVの2bのように、形質転換によりシロイヌナズナに葉や花に形態異常を誘導するものが存在する (Chapman et al., 2004; Dunoyer et al., 2004; Zhang et al., 2006)。p19の形質転換体は、既報の通り、ロゼット葉に鋸歯、花器官にがくや花卉の細化、植物体全身に矮小化等の激しい形態異常を示し、多くが不稔性または胚性致死である (図3.8 (千秋, 2012); Dunoyer et al., 2004)。CMVの2bの形質転換体も、ロゼット葉に鋸歯や上巻き、植物体全身に激しい矮小化を示し、多くが不稔性である (図3.8 (千秋, 2012); Zhang et al., 2006)。一方で、PIAMVのTGBp1形質転換体ラインのうち約60% (46ラインのうち27ライン) が野生型およびGUS形質転換体と比較して、ロゼット葉の縁が背軸側 (下側) に巻く形態異常を示す (図3.8 (千秋, 2012))。ロゼット葉の下巻きは、植物内在性のtasiRNA経路に関与する因子の欠損変異体に特徴的な表現型である (Adenot et al., 2006; Garcia et al., 2006; Peragine et al., 2004)。tasiRNA 経路は、葉の背腹極性を決定する遺伝子の発現調節に関与しており (Adenot et al., 2006; Garcia et al., 2006; Xu et al., 2006)、SGS3、RDR6、DCL4、AGO7等のtasiRNA経路因子の欠損変異体はロゼット葉の下巻きという表現型を示す (図3.8 (千秋, 2012))。TGBp1形質転換体とこれらの変異体の表現型が類似していることから、TGBp1はtasiRNA経路のいずれかの段階を阻害している可能性が考えられる。

そこで、TGBp1がtasiRNAを含むsRNAの発現量に与える影響を解析するため、TGBp1形質転換体とGUS形質転換体から抽出した小分子RNA画分を用いて大規模シーケンスを行い、解読されたリードをシロイヌナズナのゲノムへマッピングした。マッピングの条件としては、1塩基のミスマッチを許容して行い、既知のsRNAにヒットしたリードのみを次の解析に用いた。さらに、解読したリードとヒットした既知の各sRNAについて、そのsRNAの塩基長および総リード数によって正規化し、各sRNAの発現量を表す指標である Reads per kilobase of exon model per million mapped reads (RPKM) を計算した。また、既知のsRNAにヒットしたリード全体について、塩基長ごとの頻度分布を計算し、図3.9に示した。その結果、GUS形質転換体と比較して、TGBp1形質転換体では、23塩基と24塩基のsRNAが大きく増加しており、22塩基のsRNAもやや増加していた。一方で、21塩基のsRNAはやや減少していた。また、表3.3には、解読したsRNAのRPKM値を、sRNAの種類ごとに示した。前項でTGBp1形質転換植物において変動していたtasiRNAは、全体からmiRNA, rRNA, tRNA, small nuclear RNA(snRNA), small nucleolar RNA (snoRNA) を除いた「その他のRNA」に分類されているが、「その他のRNA」全体としてはTGBp1の発現による影響はほとんど見られなかった。しかし、tasiRNAのみを抽出し解析を行ったところ、TGBp1形質転換体においていずれのtasiRNAも大幅に減少していた (図3.10)。

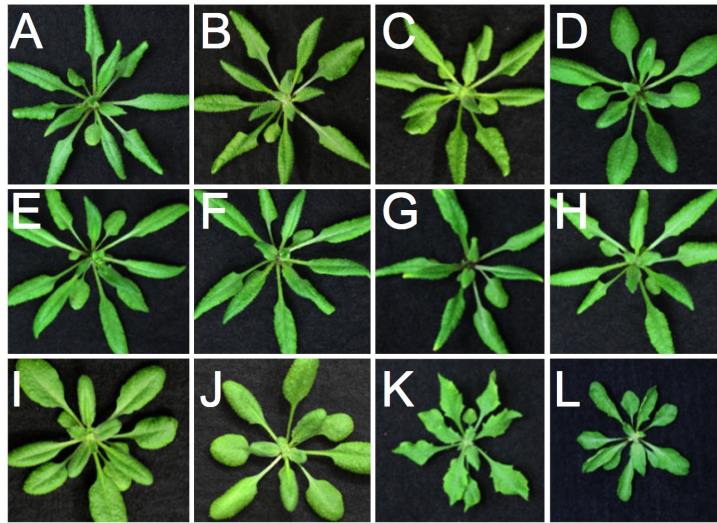


図3.8 TGBp1形質転換シロイヌナズナおよびtasiRNA経路因子欠損変異体の表現型（千秋、2012）

(A)-(D) TGBp1形質転換体ライン。順に#1F, #7A, #10D, #7D

(E)-(H) tasiRNA経路因子欠損変異体。順に*sgs3*, *rdr6*, *dcl4*, *ago7*

(I) 野生型Col-0

(J) GUS形質転換体

(K) TBSVのサブプレッサーp19の形質転換体

(L) CMVのサブプレッサー2bの形質転換体

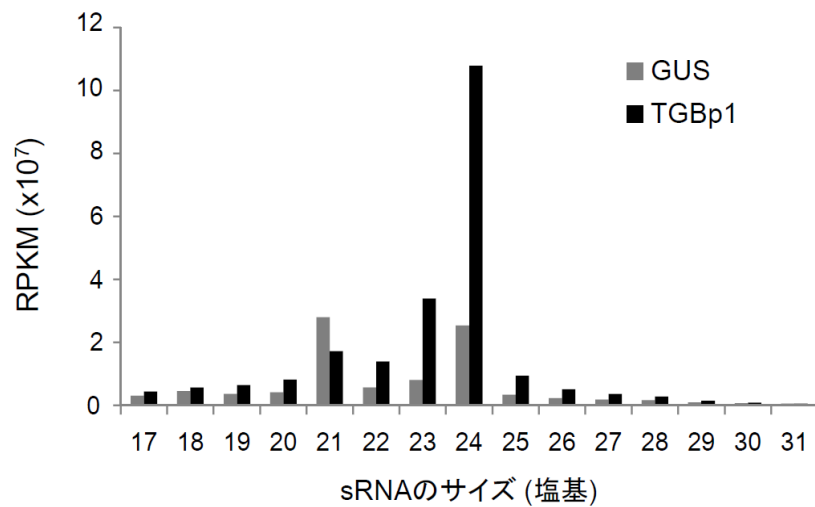


図3.9 GUS形質転換体およびTGBp1形質転換体における既知のsRNAのサイズごとのヒストグラム  
縦軸はRPKM値を表す。

表 3.3 解読された sRNA の RPKM 値の内訳

Type	GUS		TGBp1	
	Unique reads <sup>a</sup>	Total reads <sup>b</sup>	Unique reads	Total reads
miRNA	22,067,259	23,600,352	7,903,754	10,674,912
mature	22,033,542	23,561,989	7,777,525	10,531,731
hairpin	33,716	38,363	126,230	143,180
rRNA	2,779	1,891,893	5,825	2,833,327
tRNA	182,057	1,141,088	688,125	2,329,724
snRNA	612	891	460	704
snoRNA	3,447	3,806	7,626	9,014
その他の RNA	20,296	21,830	16,787	21,880

<sup>a</sup> 該当の既知の sRNA にユニークヒットしたリードの RPKM 値の合計

<sup>b</sup> 該当の既知の sRNA にユニークヒットしたリードの RPKM 値とマルチヒットしたリードの RPKM 値の合計



「その他のRNA」に分類されたsRNAの中で、GUS形質転換体と比較して、TGBp1形質転換体で1/2以下に発現減少したものは12個あり、その内7個がtasiRNAであった（表3.4）。以上より、TGBp1は大部分のtasiRNAの蓄積を大幅に減少させることが示唆された。

一方、大規模シーケンスによるmiRNAの解析の結果、TGBp1形質転換体においてTAS1 tasiRNAおよびTAS2 tasiRNAの生成を開始するmiR173は減少していた。また、TAS3 tasiRNAの生成を開始するmiR390も、ファミリー内の2つの遺伝子 (miR390a, miR390b) とも減少していた（図3.10）。一方、tasiRNA経路には関係しないmiR171ファミリー内の3つの遺伝子 (miR171a, miR171b, miR171c) については、遺伝子によって発現量の変化が異なっていた。すなわち、TGBp1の発現により、miR171aの発現量はほぼ変化しなかったが、miR171bまたはmiR171cの発現量は増加していた（ただし、miR171bおよびmiR171cの成熟配列は全く同一の配列で区別できないため、miR171bおよびmiR171cのRPKM値は合計して示している）（図3.10）。また、miR171以外のmiRNAの発現変動も網羅的に解析したが、変動の傾向は一致せず、miRNAごとに大きく異なっていた（表3.5）。

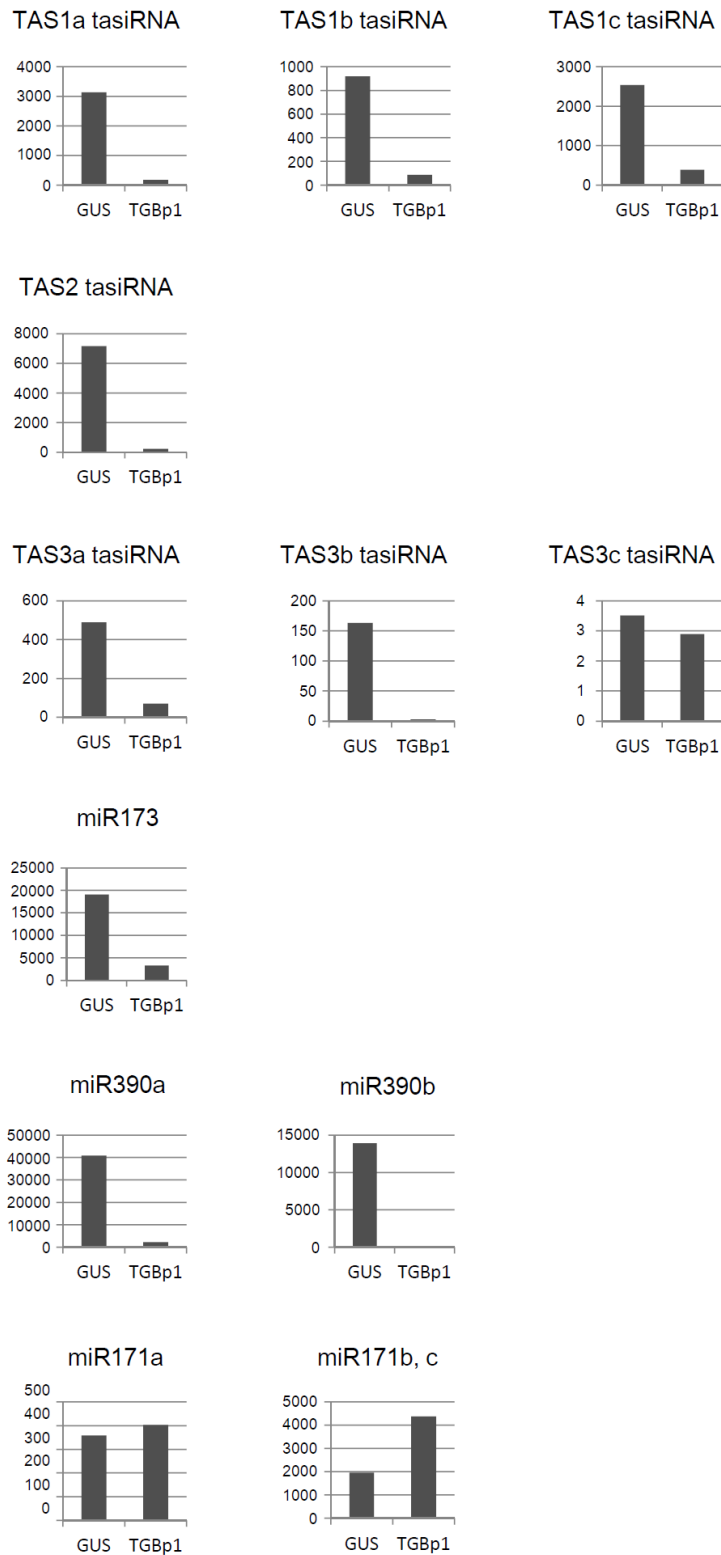


図3.10 GUS形質転換体およびTGBp1形質転換体における各sRNAの発現量  
 縦軸はRPKM値を表す。miR171bおよびmiR171cは成熟配列が全く同一であるため、2遺伝子の合計値を示した。

表 3.4 TGBp1 形質転換体で GUS 形質転換体と比較して半分以下に発現減少した sRNA

Gene	Gene family	GUS <sup>a</sup>	TGBp1 <sup>a</sup>	Log <sub>2</sub> (TGBp1/GUS)
At4g26255.1	Unknown gene	81.32	1.77	-5.52
At2g39681.1	TAS2	7171.20	209.10	-5.10
At5g49615.1	TAS3b	211.84	6.49	-5.03
At2g27400.1	TAS1a	3137.10	167.22	-4.23
At1g50055.1	TAS1b	917.94	87.54	-3.39
At3g17185.1	TAS3a	488.45	70.64	-2.79
At2g35945.1	Potential natural antisense gene, locus overlaps with AT2g35940	13.53	2.05	-2.73
At2g39675.1	TAS1c	2534.72	389.38	-2.70
At3g25795.1	TAS4	10.20	2.63	-1.96
At1g70185.1	Unknown gene	58.51	17.73	-1.72
At1g53233.1	Potential natural antisense gene, locus overlaps with AT1g53230	4.23	1.48	-1.51
At2g24755.2	Potential natural antisense gene, locus overlaps with AT2g24750 and AT2g24760	27.63	11.01	-1.33

<sup>a</sup>RPKM 値を表す

表 3.5 リードがヒットした miRNA の一覧とその RPKM 値

Gene family	GUS	TGBp1	Log <sub>2</sub> (TGBp1/GUS)
miR156a	258.61	1.88	-7.1
miR156b	8341.38	90.43	-6.53
miR156c	258.61	1.88	-7.1
miR156d	8708.47	16116.34	0.89
miR156e	3.13	1.88	-0.73
miR156f	3.13	1.88	-0.73
miR156g	1.17	1.03	-0.18
miR156h	262.57	2701.55	3.36
miR157a	182.30	776.04	2.09
miR157b	182.30	776.04	2.09
miR157c	19924.32	104563.40	2.39
miR157d	4821.71	3475.02	-0.47
miR158a	184052.26	581668.54	1.66
miR158b	533.49	847.06	0.67
miR159a	19284711.95	4601826.17	-2.07
miR159b	1900874.39	288646.93	-2.72
miR159c	57564.80	20862.75	-1.46
miR160a	225.39	651.58	1.53
miR160b	981.19	100.80	-3.28
miR160c	225.39	3635.49	4.01
miR161.1	55790.67	57474.05	0.04
miR161.2	55790.67	57474.05	0.04
miR162a	3817.37	26678.50	2.81
miR162b	33397.60	140664.25	2.07
miR163	152961.16	130450.72	-0.23
miR164a	1530.68	1678.78	0.13
miR164b	1530.68	36.70	-5.38
miR164c	246.14	345.72	0.49
miR165a	43918.74	331414.55	2.92
miR165b	11995.34	104179.22	3.12
miR166a	61028.44	782276.93	3.68
miR166b	861.95	4485.82	2.38
miR166c	135443.85	741622.76	2.45
miR166d	855.80	3373.79	1.98
miR166e	1439.14	8404.11	2.55
miR166f	1439.14	8475.84	2.56
miR166g	1433.42	61.43	-4.54
miR167a	803.60	9421.34	3.55
miR167b	1198.77	5080.51	2.08
miR167c	1.00	180.10	7.49
miR167d	7923.89	1686562.19	7.73

miR168a	20141.67	20149.74	0
miR168b	4807.90	7682.73	0.68
miR169a	223.81	350.85	0.65
miR169b	45.96	90.88	0.98
miR169c	1.16	90.49	6.28
miR169d	25.81	137.26	2.41
miR169e	25.81	3.00	-3.1
miR169f	10.92	25.21	1.21
miR169g	ND <sup>a</sup>	25.21	+ <sup>b</sup>
miR169g*	60.54	1457.84	4.59
miR169h	5.25	45.74	3.12
miR169i	5.25	24.33	2.21
miR169j	15.18	1.96	-2.95
miR169k	5.25	45.74	3.12
miR169l	15.18	1.96	-2.95
miR169m	5.25	23.37	2.15
miR169n	15.18	177.10	3.54
miR170	30.77	45.74	0.57
miR171a	358.24	403.69	0.17
miR171b	983.42	9.76	-6.65
miR171c	983.42	4377.10	2.15
miR172a	5870.76	987.01	-2.57
miR172b	5870.76	498.96	-3.56
miR172b*	29033.37	17002.00	-0.77
miR172c	158527.45	62193.13	-1.35
miR172d	6966.28	9658.49	0.47
miR172e	171.38	2.03	-6.4
miR173	19097.34	3289.65	-2.54
miR1886.1	670.83	25549.55	5.25
miR1886.2	670.83	25549.55	5.25
miR1886.3	30.77	45.74	0.57
miR1887	60.54	135.23	1.16
miR1888	328.47	179.97	-0.87
miR2111a	ND	45.74	+
miR2111a*	ND	45.74	+
miR2111b	ND	45.74	+
miR2111b*	ND	ND	※ <sup>c</sup>
miR2112-3p	60.54	ND	- <sup>d</sup>
miR2112-5p	30.77	45.74	0.57
miR2933a	4083.03	17735.99	2.12
miR2933b	315.21	1363.53	2.11
miR2934	30.77	ND	-
miR2935	370.42	4699.07	3.67

miR2936	57.83	ND	-
miR2937	30.77	ND	-
miR2938	30.77	45.74	0.57
miR2939	30.77	45.74	0.57
miR319a	1039150.85	464825.50	-1.16
miR319b	33423.03	8884.96	-1.91
miR319c	12833.03	4942.61	-1.38
miR3434	94.78	ND	-
miR3434*	32.26	ND	-
miR3440b-3p	60.54	269.46	2.15
miR390a	40813.99	2355.98	-4.11
miR391	4555.87	1030.10	-2.14
miR3932a	8.50	68.12	3
miR3932b	767.53	68.12	-3.49
miR3933	30.77	224.72	2.87
miR393a	185.71	4604.08	4.63
miR393b	185.71	53.28	-1.8
miR394a	484.98	3023.90	2.64
miR394b	954.93	31.84	-4.91
miR395a	80.39	217.26	1.43
miR395b	30.07	358.95	3.58
miR395c	30.07	358.95	3.58
miR395d	80.39	217.26	1.43
miR395e	80.39	217.26	1.43
miR395f	925.28	336.58	-1.46
miR396a	11012.74	10769.80	-0.03
miR396b	6672.86	10440.63	0.65
miR397a	ND	45.74	+
miR397b	ND	135.23	+
miR398a	58.72	ND	-
miR398b	1892.33	202.35	-3.23
miR398c	1892.33	202.35	-3.23
miR399a	30.77	1.27	-4.6
miR399b	ND	2053.77	+
miR399c	ND	3585.55	+
miR399d	ND	1.09	+
miR399f	ND	403.69	+
miR400	417.79	627.41	0.59
miR402	57.83	129.13	1.16
miR403	15154.12	47652.84	1.65
miR404	27.05	79.30	1.55
miR405a	ND	700.79	+
miR405b	27.05	118.45	2.13



miR405d	209.39	5.92	-5.15
miR406	ND	ND	※
miR407	60.54	45.74	-0.4
miR408	1429.98	1880.23	0.39
miR414	ND	45.74	+
miR416	ND	45.74	+
miR4221	ND	43.71	+
miR4228	ND	90.49	+
miR4239	30.77	ND	-
miR4240	ND	ND	※
miR4243	ND	45.74	+
miR426	ND	ND	※
miR447a	6825.86	186.08	-5.2
miR447b	6825.86	186.08	-5.2
miR447c	105.20	15.24	-2.79
miR472	512.51	ND	-
miR771	143.09	171.84	0.26
miR773	239.16	90.49	-1.4
miR773b	ND	ND	※
miR773b*	32.26	278.09	3.11
miR775	407.37	940.61	1.21
miR776	ND	45.74	+
miR777	ND	86.42	+
miR778	ND	90.49	+
miR779.1	30.77	ND	-
miR779.2	417.79	ND	-
miR780.1	209.39	2059.20	3.3
miR780.2	3335.28	2730.35	-0.29
miR781	30.77	224.72	2.87
miR782	ND	ND	※
miR783	391.58	49.87	-2.97
miR822	1787.22	ND	-
miR823	1310.90	1164.33	-0.17
miR824	1042.96	2059.20	0.98
miR825	3603.21	269.46	-3.74
miR826	ND	ND	※
miR827	90.31	179.97	0.99
miR828	ND	ND	※
miR829.1	183.34	ND	-
miR829.2	ND	ND	※
miR830	239.16	90.49	-1.4
miR830*	ND	ND	※
miR831	57.83	43.71	-0.4

miR833-3p	114.67	ND	-
miR833-5p	910.35	43.71	-4.38
miR835-3p	30.77	ND	-
miR835-5p	ND	ND	※
miR836	27.05	ND	-
miR837-3p	298.70	45.74	-2.71
miR837-5p	30.77	ND	-
miR838	30.77	45.74	0.57
miR839	268.93	45.74	-2.56
miR840	313.59	43.71	-2.84
miR841	239.16	57.05	-2.07
miR841b	60.54	168.66	1.48
miR841b*	297.83	23.37	-3.67
miR842	60.54	4922.79	6.35
miR843	655.95	269.46	-1.28
miR844	ND	179.97	+
miR844*	120.08	45.74	-1.39
miR845a	4555.87	1611.77	-1.5
miR845b	1308.19	983.32	-0.41
miR846	60.54	ND	-
miR847	179.62	314.20	0.81
miR848	739.85	214.55	-1.79
miR849	ND	45.74	+
miR850	25462.79	171.84	-7.21
miR851-3p	30.77	45.74	0.57
miR851-5p	ND	627.41	+
miR852	596.41	269.46	-1.15
miR853	57.83	43.71	-0.4
miR854a	1.46	68.26	5.55
miR854b	88.47	358.39	2.02
miR854c	1.46	68.26	5.55
miR854d	1.46	1.14	-0.36
miR854e	1.46	1.14	-0.36
miR855	ND	ND	※
miR856	143.09	43.71	-1.71
miR858	2323.09	2998.82	0.37
miR859	30.77	45.74	0.57
miR860	149.85	90.49	-0.73
miR861-3p	209.39	314.20	0.59
miR861-5p	60.54	314.20	2.38
miR862-3p	ND	ND	※
miR862-5p	30.77	ND	-
miR863-3p	447.56	135.23	-1.73

miR863-5p	483.50	43.66	-3.47
miR864-3p	ND	ND	※
miR864-5p	60.54	ND	-
miR865-3p	ND	ND	※
miR865-5p	179.62	1164.33	2.7
miR866-3p	ND	47.98	+
miR866-5p	30.77	1432.79	5.54
miR867	60.54	403.69	2.74
miR868	ND	45.74	+
miR869.1	45.66	ND	-
miR869.2	45.66	ND	-
miR870	ND	90.49	+

---

<sup>a</sup> ND ; not detected

<sup>b</sup>+ ;GUS 形質転換体のみで検出されなかった miRNA

<sup>c</sup> ※ ; GUS 形質転換体、TGBp1 形質転換体の両者で検出されなかった miRNA

<sup>d</sup>- ; TGBp1 形質転換体のみで検出されなかった miRNA

### 3.2 TAS 前駆体 RNA の切断解析

TGBp1形質転換体において、*tasiRNA*生成経路の最初の段階でTAS前駆体RNAを切断するmiRNAの蓄積量は、野生型やGUS形質転換体よりも減少していた(図3.10)。しかしながら、完全には消失しておらず、検出可能であった。よって次に、TGBp1形質転換体において、miRNAによるTAS前駆体RNAの切断が起きているかどうかを調べることにした。TAS2前駆体RNAを検出するプローブを用いてノーザンブロット解析を行ったところ、野生型およびGUS形質転換体では、miR173/AGO1複合体によるTAS2前駆体の5'切断断片に相当するバンドは検出されたが、3'切断断片に相当するバンド検出されなかった(図3.11)。これは、野生型ではmiRNA/AGO複合体によって切断されたTAS前駆体RNAの3'切断断片は、すぐに二本鎖化されて*tasiRNA*に加工されるため、ほとんど検出されないという既報の知見に一致する(Yoshikawa et al., 2005)。一方で、*tasiRNA*経路因子変異体*rdr6*においては、miRNA/AGO複合体によるTAS2前駆体の5'および3'切断断片の両方に相当するバンドが明瞭に検出された。この結果は、既報のように、RDR6は*tasiRNA*の合成に参与するmiRNAの蓄積やmiRNA/AGOによるTAS前駆体RNAの切断に影響しないが、*tasiRNA*経路のさらに下流の段階の、二本鎖RNAの合成や、二本鎖RNAからの*tasiRNA*の切り出しの段階に参与することを示している(Yoshikawa et al., 2005)。*sgs3*変異体ではTAS2前駆体の5'および3'切断断片の両方とも検出されなかった。この結果は、SGS3がTAS前駆体切断断片の安定化に寄与するという既報の知見と一致している(Yoshikawa et al., 2005)。そこで、TGBp1形質転換体においてTAS前駆体RNAを検出したところ、*rdr6*と同様に、miRNA/AGO複合体によるTAS2切断断片に相当する2本のバンドが検出された。これにより、TGBp1形質転換体ではmiRNAとAGOがRISCを形成し、前駆体RNAを切断していることが示され、TGBp1による*tasiRNA*経路の阻害はこの段階では起きていないことが示唆された。以上より、TGBp1は*tasiRNA*生成経路の中で、さらに下流の、RDR6による二本鎖RNA合成の段階、あるいはDCL4による二本鎖RNAからの*tasiRNA*の切り出しの段階を阻害していることが示唆された。

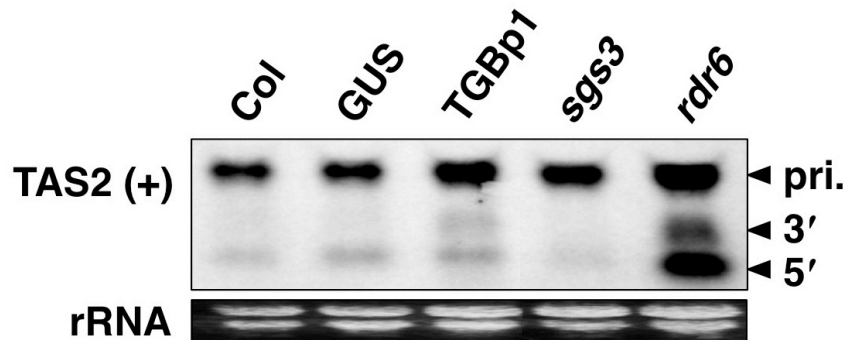


図3.11 TAS前駆体RNA切断断片の検出

各植物の生殖成長組織から全RNAを抽出し、ノーザンブロッティングによりTAS2前駆体RNAを検出した。

pri: TAS2前駆体RNA全長バンド、3': TAS2前駆体RNAの3'切断断片、5': TAS2前駆体RNAの5'切断断片

### 3.3 二本鎖RNAの蓄積量の解析

TGBp1形質転換体では*rdr6*変異体や*dcl4*変異体と同様に、miRNA/AGO複合体によるTAS前駆体RNAの切断には影響がないが、*tasiRNA*の蓄積が抑制されていた。これにより、TGBp1はSGS3/RDR6による二本鎖RNAの合成の段階を阻害している可能性が考えられた。よってTGBp1が二本鎖RNA合成に与える影響を調べるため、RNase Protection assay (Zheng et al., 2010) によって二本鎖RNAの検出を試みた。野生型、*tasiRNA*経路因子変異体*rdr6*、*dcl4*およびTGBp1形質転換体 (#1F, #7A) から抽出した全RNAを一本鎖RNA特異的RNase (RNase ONE) で処理し、次いでTAS2またはTAS3前駆体RNA配列特異的プライマーを用いてRT-PCRを行った。変異体*dcl4*では、RNase ONEを処理した場合にもTAS2、TAS3の両バンドが検出され、二本鎖RNAが蓄積していることが確認された (図3.12, レーン9, 10)。この結果は、変異体*dcl4*では二本鎖RNAは合成されるものの、DCL4によって*tasiRNA*が切り出されないため、二本鎖RNAが蓄積することを表している (Xie et al., 2005; Yoshikawa et al., 2005)。一方、二本鎖RNA合成に関与するRDR6の変異体 (Curaba and Chen, 2008; Peragine et al., 2004; Yoshikawa et al., 2005; Zheng et al., 2010) では、RNase ONEを処理した場合に、二本鎖RNAの蓄積は検出されなかった (図3.12, レーン7,8)。TGBp1形質転換体では、いずれのラインでもRNase ONEを処理した場合に、TAS2およびTAS3で検出されず、*rdr6*と同様のパターンを示した (図3.12, レーン3-6)。野生型ではRNase ONEを処理した場合にはTAS2およびTAS3でバンドが検出されなかった (図3.12, レーン1-2)。野生型では通常、TAS前駆体RNAの切断断片から合成された二本鎖RNAは直ちに*tasiRNA*に加工されるため (Yoshikawa et al., 2005)、RT-PCRで検出可能な長鎖の二本鎖RNAはほとんど蓄積していないと考えられる。これにより、TGBp1形質転換体においては、二本鎖RNAの蓄積量が減少したと考えられる。この原因としては、TGBp1により二本鎖RNA合成が阻害されている可能性と、合成された二本鎖RNAが直ちに*tasiRNA*へと加工されている可能性が挙げ

られる。しかし、TGBp1形質転換体においては、*tasiRNA*はほぼ検出できないレベルまで減少しているため、後者の可能性は低いと考えられる。以上より、TGBp1 は*tasiRNA* 経路中の二本鎖RNA 合成の段階を阻害していることが示唆された。

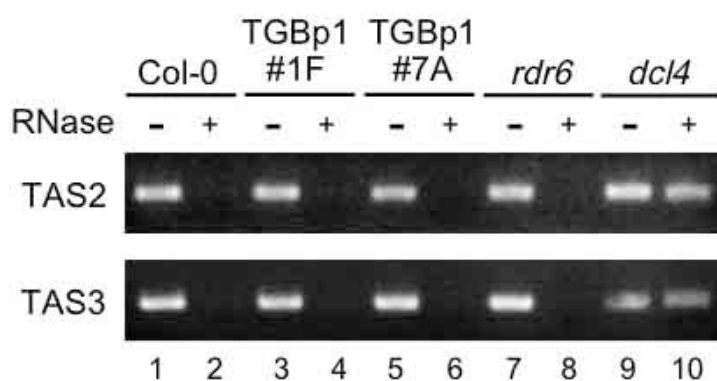


図3.12 TAS2およびTAS3の二本鎖RNAの検出

RNase protection assay による検出。各シロイヌナズナから抽出した全RNAを、DNase Iで処理した後、一本鎖RNA特異的RNaseで処理した。その後、そのRNAを鋳型に特異的RT-PCRを行った。



### 3.4 TGBp1 形質転換体における 2b 遺伝子欠損 CMV の蓄積量に関する解析

TGBp1がSGS3およびRDR6による二本鎖RNA合成を抑制することで、実際にウイルス感染を促進するかどうかを解析するため、野生型Col-0、*sgs3*、*rdr6*およびTGBp1形質転換体 (#1F, #7A) のシロイヌナズナに、サプレッサー2bを欠損したCMV変異体であるCMV- $\Delta$ 2bを接種した。CMV- $\Delta$ 2bはサプレッサーを欠損しているため、野生型Col-0にほとんど病徴を誘導せず、ウイルス蓄積量も非常に少ないが、変異体*sgs3*および*rdr6*には激しい病徴を誘導し、ウイルス蓄積量も多い。このことから、CMVに対するRNAサイレンシングでは、SGS3/RDR6による増幅の過程が重要であることが示唆されている (Wang et al., 2011)。変異体*sgs3*および*rdr6*へCMV- $\Delta$ 2bを接種した結果、既報の通り激しい病徴を誘導した (図3.13A)。ノーザンブロット解析により、ウイルスRNA蓄積量を解析したところ、*sgs3*および*rdr6*では、ウイルス蓄積量は野生型Col-0と比較して約5-11倍増加していた (図3.13B)。続いて、TGBp1形質転換体 (#1F, #7A) にCMV- $\Delta$ 2bを接種したところ、*sgs3*および*rdr6*で見られたものよりも激しい病徴が観察され (図3.13A)、ウイルスRNA蓄積量は、野生型Col-0と比較して約12-38倍増加していた (図3.13B)。以上より、TGBp1の形質転換体はCMV- $\Delta$ 2b感染時に、変異体*sgs3*および*rdr6*と同様の高いウイルス感受性を示すことが明らかとなった。このことから、TGBp1はSGS3およびRDR6の機能を抑制することで、ウイルスに対する防御としてのRNAサイレンシングを抑制し、ウイルス感染を促進していることが示唆された。

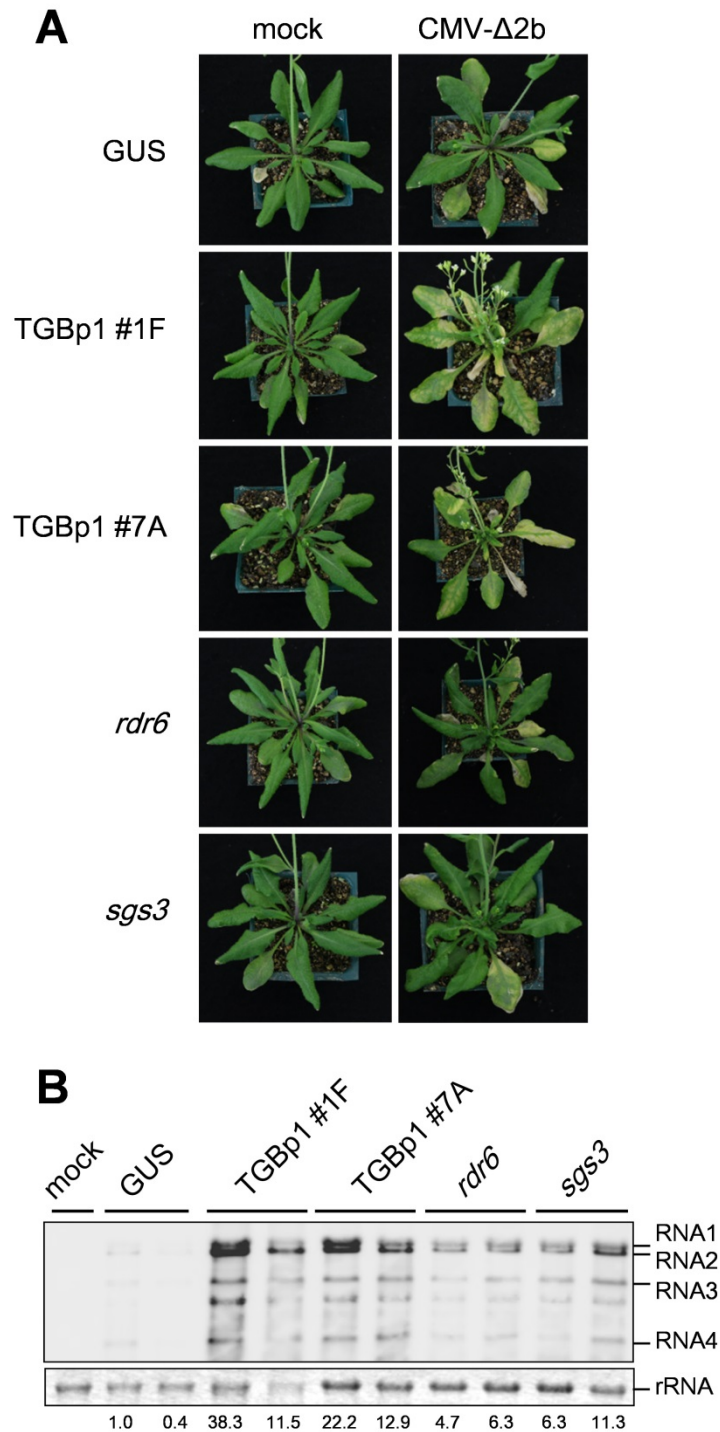


図3.13 TGBp1形質転換体におけるCMV- $\Delta$ 2b蓄積量の解析

(A) CMV- $\Delta$ 2bを機械接種した各シロイヌナズナの接種後13日の病徴。(B) ノーザンブロット解析によるCMV- $\Delta$ 2bのウイルスRNA蓄積量の解析。RNA1-4に存在する3'末端の240塩基の保存配列を検出するプローブを用いた。泳動量のコントロールとしてrRNAのエチジウムブロマイドの染色像を下段に示した。各泳動図の下の数値は、RNA1, RNA2およびRNA3の蓄積量の合計値を表す (野生型Col-0を1.0とする)。

## 4. 考察

### 4.1 PLAMV の TGBp1 による RNA サイレンシング抑制機構

本研究では、植物ウイルスが持つ主要なサプレッサーの1つである*Potexvirus*属ウイルスのTGBp1が、二本鎖RNA合成を阻害し、RNAサイレンシングを抑制していることを明らかにした。現在、サプレッサーによるRNAサイレンシング抑制機構は、siRNA結合やAGO1活性の阻害が一般的であると考えられている。本研究では、サプレッサーが二本鎖RNA合成阻害を介してRNAサイレンシングを抑制することを初めて実証した。さらにTGBp1形質転換体においては、CMV- $\Delta$ 2bの蓄積量が増加したことから、TGBp1はRNAサイレンシングを抑制することにより、ウイルスの増殖を促進していることが明らかとなった。サプレッサーによる二本鎖RNA合成阻害は、普遍的なRNAサイレンシング抑制戦略であるかもしれない。実際に、これまでに二本鎖RNA合成段階の阻害に関与する可能性のあるサプレッサーが3例報告されている。*Tenuivirus*属ウイルスのrice stripe virusが持つp2および*Rhabdovirus*属ウイルスのrice yellow stunt virusが持つp6は、それぞれSGS3、RDR6と相互作用をする (Du et al., 2011; Guo et al., 2013)。*Geminivirus*属ウイルスのtomato yellow leaf curl virusの持つV2も、SGS3と結合し、細胞内で共局在する (Glick et al., 2008)。また、V2は二本鎖RNAと結合し、SGS3が自らの基質である二本鎖RNAに結合するのを妨げる可能性が指摘されている

(Fukunaga and Doudona, 2009)。このように、これらのサプレッサーも二本鎖RNA合成を阻害する可能性が指摘されていたが、その機能に関する生物学的意義は不明である。本研究では、TGBp1が二本鎖RNA合成を阻害する分子メカニズムの一端を明らかとした。ノーザンブロット解析 (図3.11)、RNase protection assay (図3.12) の結果から、TGBp1が二本鎖RNA合成を阻害することが明確に証明された。この実験結果は、TGBp1形質転換体においては、CMV- $\Delta$ 2bの蓄積量が増加したという結果によって裏付けられた (図3.13)。以上の発見は、RNAサイレンシングにおける二本鎖RNA合成の段階を阻害するサプレッサーの詳細な機能解明に貢献すると考えられる。

TGBp1を形質転換したシロイヌナズナは葉の下巻きという生育異常を示す。これまでに、副作用として植物内在性のRNAサイレンシング経路を攪乱し生育異常を引き起こすサプレッサーはいくつか報告されている。このような生育異常は、植物内在性のRNAサイレンシング経路とウイルス防御機構としてのRNAサイレンシング経路で共通して機能する植物因子が存在し、サプレッサーがそれらの植物因子をターゲットとするためであると考えられている (Chapman et al., 2004; Dunoyer et al., 2004; Kasschau et al., 2003; Moissiard et al., 2007; Zhang et al., 2006)。例えば、AGO1のスライサー活性を阻害して内在性のmiRNA経路を阻害するCMVの2bは、植物に形質転換すると、*dcl1*, *hyll*, *se*, *ago1*のようなmiRNA経路の変異体と同様の形態異常を誘導する。同様に、TGBp1の形質転換によって誘導された表現型は、もう一つの植物内在性RNAサイレンシング経路であるtasiRNA経路に関わる因子の変異体

(*sgs3*, *rdr6*, *dcl4*および*ago7*) の表現型と酷似している (千秋、2012)。実際、TGBp1形質転換体では、tasiRNAの蓄積量が著しく減少していた (図3.10)。

TGBp1の形質転換体においては、tasiRNA生成に関わるmiRNA (miR173, miR390) の蓄積量が減少していた (図3.10)。しかしながら、miRNA / AGO 複合体によるTAS 前駆体RNA 切断は正常に起こっていたため (図3.11)、TGBp1形質転換体で検出されたmiRNA量で、切断には充分であったと考えられる。これらのmiRNAの蓄積量が減少した原因は不明であるが、全てのmiRNAの蓄積量が一様に減少している訳ではないことから (図3.10; 表3.5)、全てのmiRNAの生成や蓄積に関与するDCL1などの機能を阻害しているとは考えづらい。TGBp1はmiR173およびmiR390を含む、限られた特定のmiRNAファミリーの生成や蓄積に何らかの阻害的な影響を与えている可能性が考えられる。

RNAサイレンシングの増幅過程は、ウイルス抵抗性において重要な役割を果たしている。実際、*sgs3*や*rdr6*などの変異体では、数種の植物ウイルスの蓄積量が著しく増加する (Garcia-Ruiz et al., 2010; Wang et al., 2011)。なかでも、CMV- $\Delta$ 2bが*rdr6*や*sgs3*に感染した際には、野生型のCol-0と比較して、siRNAの元となるウイルスRNAの蓄積量が大幅に増加するにも関わらず、ウイルスゲノム由来siRNAの蓄積量は減少する (Wang et al., 2011)。このことから、CMV- $\Delta$ 2bが野生型のCol-0に感染した際に生じるsiRNAの大半は、SGS3 / RDR6を介するRNAサイレンシング増幅過程で生成されたsecondary siRNAであることが示唆されている (Wang et al., 2011)。本研究においては、TGBp1形質転換体におけるCMV- $\Delta$ 2bの蓄積量が、GUS形質転換体における蓄積量よりも著しく多いことが示された (図3.13)。このことは、TGBp1は、ウイルスRNAに対するRNAサイレンシングの増幅を抑制することによりウイルス感染を促進している可能性を示唆している。また、TGBp1形質転換体におけるCMV- $\Delta$ 2bの蓄積量が*rdr6*や*sgs3*における蓄積量よりも多かった (図3.13)。この原因は不明であるが、TGBp1はSGS3やRDR6以外のDCLやAGOなどの他の因子も抑制する可能性を示しているのかもしれない。

#### 4.2 TGBp1 のヘリカーゼ活性が RNA サイレンシングの抑制において果たす役割

本研究では、RNAサイレンシングの抑制におけるTGBp1の主な役割は、SGS3およびRDR6による二本鎖RNA合成の阻害であることを示した。しかし、二本鎖RNA合成の阻害以外にも、互いに背反ではないが、二本鎖RNAの蓄積を阻害するために果たしている役割があるかもしれない。*Potexvirus*属ウイルスのTGBp1は内部に7つのヘリカーゼ保存モチーフを保持しており、*in vitro*において、部分的に二本鎖化したRNAを引きはがす活性を持つことが知られているため (Kalinina et al., 2002)、このRNAヘリカーゼ活性がTGBp1形質転換体における二本鎖RNAの蓄積量減少と関係しているかもしれない。SGS3/RDR6によって合成された二本鎖RNAが、合成された直後にTGBp1と結合し乖離されるという仮説は非常に魅力的である。植物の持つSDE3タンパク質も、TGBp1と同様ヘリカーゼ様タンパク質であり、ウイル

スに対するRNAサイレンシングやRNAサイレンシングの拡大に必要な因子である (Dalmay et al., 2000; Dalmay et al., 2001)。SDE3は、RDR6によって合成された二本鎖RNAを一本鎖に乖離させ、RDR6のテンプレートを増やす役割を担うと考えられている。加えて、AGO1やAGO2と結合することで、AGOによって切断された一本鎖RNAを素早くRDR6に供給することにより、RNAサイレンシングの増幅を促進する (Garcia et al., 2012; Himber et al., 2003)。TGBp1とSDE3はともにRNAヘリカーゼであるため、TGBp1がSDE3と二本鎖RNAをめぐって競合するかもしれない、今後さらなる解析が必要である。

#### 4.3 *Potexvirus* 属ウイルスの TGBp1 による RNA サイレンシング抑制メカニズム

近年の研究で、*Potexvirus*属のタイプ種であるPVXのTGBp1は、AGO1に結合し、プロテアソーム系を介してAGO1を分解することが示唆された (Chiu et al., 2010)。本研究では、PIAMVのTGBp1とAGO1が結合するかどうかは解析していないが、TGBp1形質転換体においてTAS2の前駆体RNAがAGO1により正常に切断されていることを示した。これにより、PIAMVのTGBp1はAGO1のスライサー活性を完全に阻害している訳ではないことが示唆された。さらに、PVX-TGBp1と同じくAGO1をターゲットとする他のサプレッサーとは異なり、PVX-TGBp1の形質転換は、植物体に形態異常を誘導せず、植物体内のmiRNAの蓄積にも影響を与えない (Dunoyer et al., 2004; Moissiard et al., 2007)。このことから、PVX-TGBp1のAGO1抑制能は、*ago1*変異体と同様の表現型を誘導するほど強くはないという解釈が可能である。しかしながら、*Tombusvirus*属ウイルスのcymbidium ringspot virusが持つp19や、CMVの2bのように (Burguán and Havelda, 2011)、*Potexvirus*属ウイルスのTGBp1がウイルスに対するRNAサイレンシング経路の中の複数の因子をターゲットとしている可能性も考えられる。実際、PIAMV-TGBp1形質転換体におけるCMV- $\Delta$ 2bの蓄積量は、*sgs3*や*rdr6*における蓄積量よりもはるかに多かった (図3.13)。従ってPIAMV-TGBp1は、SGS3およびRDR6に加えて、AGO1, AGO2, DCL2, DCL4などの、ウイルスに対するRNAサイレンシングに関わる他の因子も抑制のターゲットとしているのかもしれない。

#### 4.4 二本鎖 RNA 合成阻害の普遍性について

人為的に導入した遺伝子配列によって誘導されるRNAサイレンシングは、sense-transgene-mediated RNA silencing (S-RNAi) と inverted-repeat-transgene-mediated RNA silencing (IR-RNAi) の2種類が存在する。S-RNAi は、一過的に外来遺伝子を導入した場合、大量に転写されたmRNAが植物のRDR6に認識されて二本鎖RNAとなり誘導される。一方、IR-RNAi は、逆位反復配列から転写されたmRNA がステムループ構造をとり、その二本鎖RNAの部分からsiRNA が切り出されるため、RDR6 による二本鎖RNA合成の過程を経ずに誘導される (図3.14)。TGBp1はこのうち、S-RNAiを抑制するが、IR-RNAiは抑制しないこと

が知られている (Senshu et al., 2009)。この知見は、TGBp1がSGS3/RDR6によるdsRNA合成を阻害するという本研究の結果により説明できる。TGBp1以外にも、tunip yellow mosaic virusのp69やtomato spotted wilt virusのNSsなどの数例のサプレッサーも、S-RNAiを抑制するがIR-RNAiを抑制しないため (Chen et al., 2004; Takeda et al., 2002)、これらのサプレッサーもSGS3やRDR6を抑制のターゲットとしている可能性がある。

さらには、RDR6によるRNAサイレンシングの増幅は、RNAサイレンシングシグナルの全身拡大に必要である (Schwach et al., 2005)。このシグナルはウイルスに先立って全身移行し、未感染細胞においてあらかじめRNAサイレンシングを誘導することでウイルスの全身移行を抑制すると考えられている (Kalantidis et al., 2008; Mlotshwa et al., 2008; Schwach et al., 2005)。したがって、ウイルスの移行阻害という点でもRDR6によるRNAサイレンシングの増幅は重要であり、この過程を抑制することは植物ウイルスにとって非常に効率的であると考えられる。よって、potato virus MのTGBp1や、apple chlorotic leafspot virusのp50、citrus tristeza virusのCPのように、RNAサイレンシングの全身拡大を抑制するようなサプレッサーも (Lu et al., 2004; Senshu et al., 2011; Yaegashi et al., 2008)、RDR6の機能を抑制している可能性がある。より詳細な解析によって、これらのサプレッサーが実際にRDR6の機能を阻害し、RNAサイレンシングの増幅過程を抑制するかどうかが明らかになると考えられる。



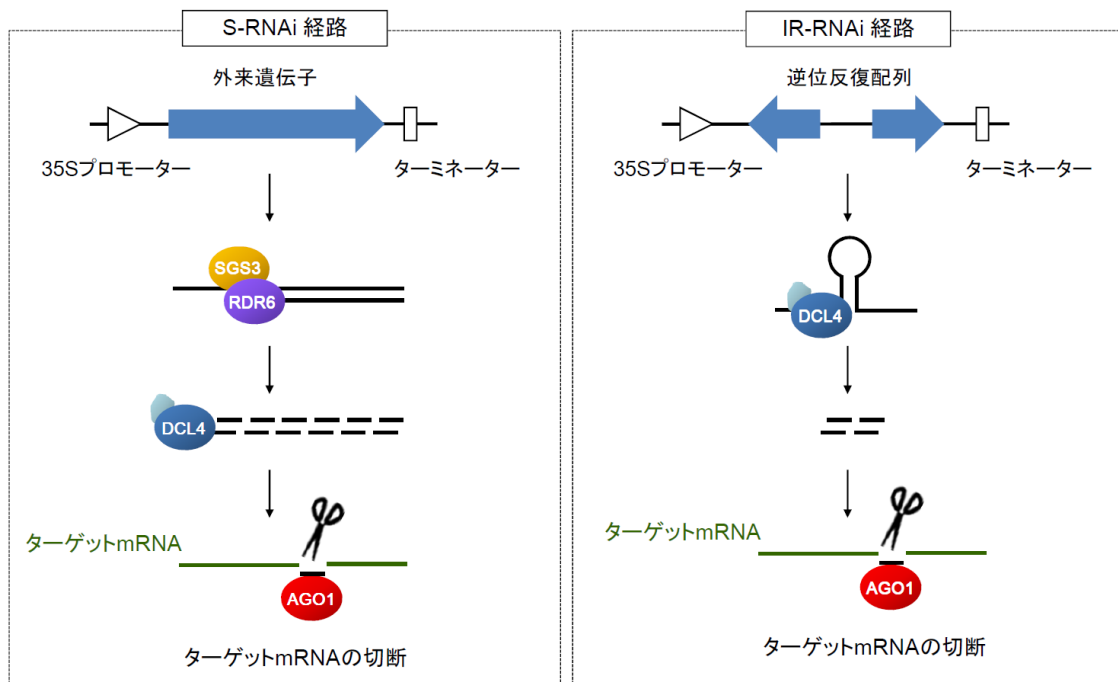


図3.14 外来遺伝子配列によって誘導されるRNAサイレンシングの模式図

S-RNAiはRDR6による二本鎖RNA合成の過程を経るが、IR-RNAiはその過程を必要としない。

## 第4章 病原性決定因子を利用した効率的なタンパク質発現系の構築

### 1. 序文

植物ウイルスベクターは、ウイルスの感染・増殖能を利用して、植物で目的遺伝子を過剰発現または発現抑制（ノックダウン）をするツールである。ウイルスゲノム内に導入したマルチクローニングサイトを利用して目的外来遺伝子を挿入した感染性クローンを用い、植物に接種を行うと、ウイルスが増殖した部位では、ウイルスのタンパク質発現機構を介して目的タンパク質が発現される。ウイルスが移行すると共に目的タンパク質が発現される部位も拡大し、最終的には植物体全体で大量に目的タンパク質を発現させることが可能となる。一方、植物が有する遺伝子のノックダウンには、ウイルスゲノム内に目的遺伝子の部分領域や逆位反復配列を挿入した感染性クローンを用いる。この感染性クローンを接種すると、ウイルスの増殖に伴って、ウイルスに挿入された配列に対する RNA サイレncing が誘導され、ウイルス RNA が切断されるとともに、本来植物体内で発現している目的遺伝子の mRNA も切断されることとなる。その後、過剰発現の時と同様、ウイルスの移行に伴い、全身において目的の植物遺伝子がノックダウンされる。ウイルスベクターを利用する場合、目的遺伝子の発現または抑制にあたって、形質転換とは異なり、組織培養を行う必要がなく非常に簡便である。現在、植物ウイルスベクターは、遺伝子の機能解析などの基礎研究からナノテクノロジーや医薬品の生産など応用分野で広く利用されている (Gleba et al., 2007; Robertson, 2004)。さらに、ウイルスベクターによって GFP などのマーカータンパク質を発現させることは、宿主植物におけるウイルスの感染プロセスの可視化を可能にする。これにより、モデル植物のエコタイプや T-DNA 挿入ライブラリーのスクリーニングを簡便に行うことができ、ウイルス感染に必要、あるいはウイルス感染を阻害する植物の因子の特定が容易になる (Decroocq et al., 2009; Yamaji et al., 2012)。こうして得られる知見は、ウイルスに対する防除戦略の確立につながると期待される。

ウイルスベクターによって、2種の異なる外来タンパク質を同じ植物細胞内で発現させることは、ウイルスベクターの実用性を検討する上で重要である。例えば、生物学的に活性のある抗体を植物細胞内で作るためには、同一の植物細胞内で重鎖と軽鎖を発現させる必要がある。しかしながら、異なる蛍光タンパク質を挿入した同種のウイルス同士が、同一細胞に共感染することなく、互いを排除し合いながら感染を拡大する “spatial separation (空間的分離)” と呼ばれる現象が、数種のウイルスについて報告されている (Dietrich and Maiss, 2003)。この空間的分離と類似した現象として、あるウイルス (一次ウイルス) に感染した植物に、近縁な二次ウイルスを接種しても感染しないという、“クロスプロテクション” と呼ばれる現象が古くから知られている。RNA サイレncing の発見後、クロスプロテクションは近縁種であるか否かにかかわらず 2種のウイルスゲノム間に相同な配列があるときに起こることが明らかにされ、RNA サイレncing に起因する現象であることが示された

(Ratcliff et al., 1997; Ratcliff et al., 1999)。相同な配列を持つウイルス同士が互いの感染を抑制するという点から、空間的分離も RNA サイレンシングの影響によって生じる現象であると推測されているが、その真偽は不明である。

本章においては、第3章と同様、*Potexvirus* 属の PIAMV を用いて実験を行った。これまでに *Potexvirus* 属におけるウイルスベクターの構築は、PVX で初めて報告され、最も広く利用されている (Baulcombe et al., 1995)。その他、宿主域の異なる *Potexvirus* 属ウイルスがベクターとして利用を試みられており、マメ科植物に感染する white clover mosaic virus (Balmori-Melian et al., 2002)、キノアに感染する zygocactus virus X (Koenig et al., 2006)、ランに感染する cymbidium mosaic virus (Lu et al., 2009)、*N. benthamiana* に感染する foxtail mosaic virus (Liu and Kearney, 2010)、シロイヌナズナおよび *N. benthamiana* に感染する alternanthera mosaic virus (Lim et al., 2010a)、*N. benthamiana* に感染する pepino mosaic virus (Sempere et al., 2011) が挙げられる。これらのウイルスベクターは、いずれも CP のサブゲノムプロモーター配列を重複させることで目的タンパク質を発現させている。また、foot-and-mouth-disease virus (FMDV) が持つ、タンパク質自己切断配列である 2A 配列を挟んで、目的タンパク質と CP を融合タンパク質として翻訳させ、後の自己切断により目的タンパク質を単独発現させるベクターも 2 例報告されている (Cruz et al., 1996; Sempere et al., 2011)。

PIAMV は *Potexvirus* 属ウイルスの中でも分子生物学的研究が精力的に進められており、近年壊死誘導機構をはじめとして、感染から病徴発現、抵抗性などに関与する因子や誘導メカニズムが明らかとなりつつある (Hashimoto et al., 2012; Komatsu et al., 2010; Komatsu et al., 2011; Yamaji et al., 2012)。本研究では、前章で示した PIAMV の病原性決定因子 TGBp1 の強いサイレンシング抑制能を利用した、PIAMV の新しいベクターの構築について報告する。この PIAMV ベクターは植物宿主-ウイルス間相互作用の分子生物学的研究に大いに役立つと考えられる。本章ではこの PIAMV ベクターの構築の詳細と、その性質について報告する。

## 2. 材料および方法

### 2.1 供試ウイルスおよび接種法

PIAMV の Li1 分離株の接種には感染性 cDNA クローン pLi1 を用いた (図 4.1)。pLi1 はバインナリーベクター-pCAMBIA1301 (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/home.html>) の T-DNA 領域内に、cauliflower mosaic virus (CaMV) 由来 35S プロモーター、Li1 ウイルスゲノム cDNA ならびに Nos ターミネーターが順に挿入されたものである。

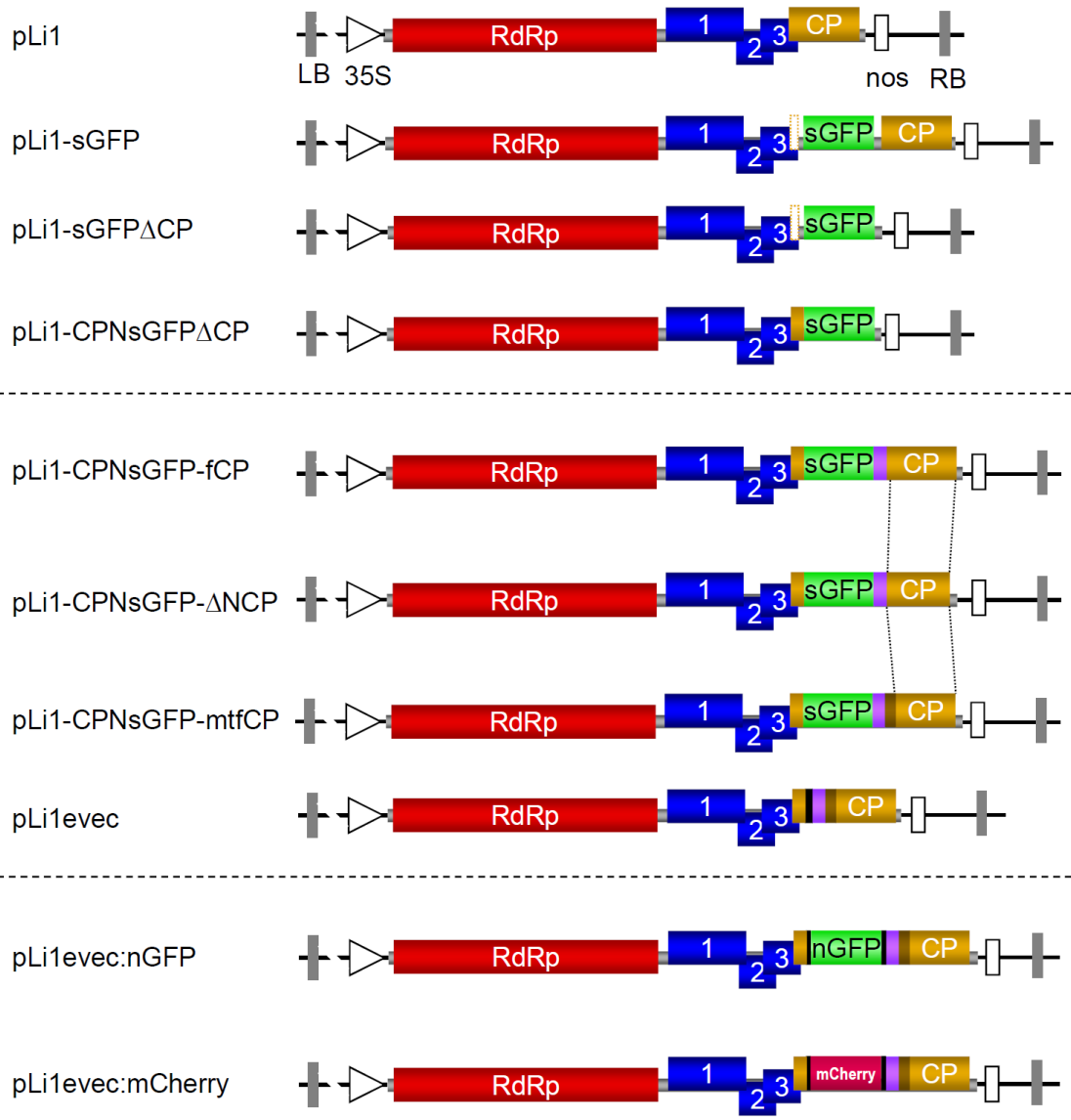


図 4.1 本研究で構築した PIAMV ベクターのコンストラクト図

四角は各 ORF を示す。点線で囲まれた四角は開始コドンへの変異挿入により翻訳されなくなった CP の N 末端領域を表す。紫色および茶色の四角は、それぞれ FMDV の 2A 配列および同義置換変異を導入した CP の N 末端領域を示す。灰色の四角は Left border (LB) および Right border (RB) を表す。白色の三角形は CaMV の 35S プロモーター、白色の四角は nopaline synthase (Nos) ターミネーターを示す。

本章では、大部分のウイルスの接種およびタンパク質の発現には、アグロインフィルトレーション法（第3章2.5項参照）を用いた。以後、簡略化のため特に断りがない場合に限り、接種に用いたアグロバクテリウム菌株は形質転換されたバイナリーベクターの名称で呼ぶこととし、接種濃度は  $O.D._{600}=0.5$  とした。また、プラスミドを表す場合には名称の前に p の文字を付け、ウイルスや変異体ウイルスを表す場合には p の文字を付けずに表記することとした。

シロイヌナズナへのウイルス接種は機械的接種法を用いて、具体的には以下の手順に従って行った。Li1-evec:nGFP に感染した *N. benthamiana* からサンプリングした感染葉に対し、約 10 倍量 (w/v) の 0.1 M リン酸バッファー (pH 7.0) を加え、乳鉢と乳棒により磨砕し、カーボランダム (400~600 メッシュ) を加えてさらに磨砕してウイルス粗汁液とした。接種するシロイヌナズナの展開葉 2 枚に、ウイルス粗汁液を染み込ませた綿棒で軽くなでるようにして機械的接種を行った。直後に接種葉に水道水をかけ、カーボランダムを洗い流した。

GFP 遺伝子を発現する PVX (PVX-GFP) の接種には、感染性 cDNA クローン pCAMI を用いたアグロインフィルトレーション法により行った (図 4.2; Takahashi et al., 2006)。pCAMI は pLi1 と同様に、バイナリーベクター pCAMBIA1301 の T-DNA 領域内に、CaMV の 35S プロモーター、PVX-GFP ゲノム cDNA ならびに Nos ターミネーターが順に挿入されたものである。GFP 遺伝子は、PVX ゲノム中の CP 遺伝子がコードされる位置に挿入されており、さらにその C 末端に FMDV 2A 配列をはさんで CP が融合されている。

接種植物には、*N. benthamiana* または GFP 遺伝子形質転換 *N. benthamiana* (ライン 16c、D. C. Baulcombe 博士より分譲いただいた) およびシロイヌナズナ (エコタイプ Col-0) を用いた。植物は、全実験期間を通して、光照射下 (25°C) 15 時間、暗黒下 (20°C) 9 時間に設定した人工気象室において生育させた。

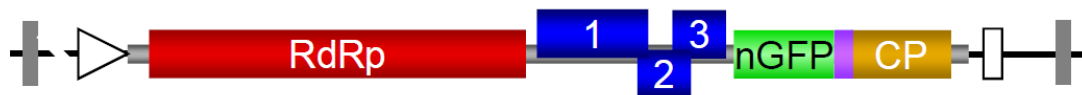


図 4.2 pCAMI のコンストラクト図

35S プロモーターの下流に PVX-GFP の全長ゲノムが挿入されている。nGFP の C 末端には FMDV の 2A 配列および CP 遺伝子が融合されている。

## 2.2 ベクター構築

本研究で構築したベクターの構築手順を以下に示す。なお、それぞれのベクターのコンストラクト図は図 4.1 に示し、用いたプライマーの配列は全て表 4.1 にまとめた。また、全ての PCR 反応には KOD -Plus- (TOYOBO) を用い、構築作業の最終段階ではシーケンスを行うことにより目的の塩基配列であることを確認した。

### (i) pLi1-sGFP

構築手順の概要は図 4.3 に示す。pLi1-sGFP を構築するため、まず pLi1 の CP 遺伝子の下流にマルチクローニングサイトを導入し pLi1vec を作出した。はじめに、pLi1 をテンプレートとして、フォワードプライマー Li-3073F とリバースプライマー Plvec-R を用いて PCR を行い、Li1 の RdRp 遺伝子の途中から CP の開始コドン付近までの領域ならびに、その 3'末端にマルチクローニングサイトを付加した DNA 断片 A を得た。さらに pLi1 をテンプレートとして、フォワードプライマー Plvec-F とリバースプライマー polydT-ClaI を用いて PCR を行い、5'末端にマルチクローニングサイトを付加した、TGBp3 の途中から poly (A) 配列までの領域からなる DNA 断片 B を得た。続いて、これらの DNA 断片をテンプレートとして混合し、フォワードプライマー Li-3073F およびリバースプライマー polydT-ClaI を用いてリコンビナント PCR を行った。得られた PCR 産物を *Bgl*III (Li1 の 3212 番目に該当する RdRp 内の塩基) および *Spe*I (Li1 の 5981 番目に該当する CP-3'UTR 間の塩基) で切断したのち、pLi1 の同一領域に挿入し、pLi1vec を得た。pLi1vec は pLi1 の元の CP 領域に挿入されたマルチクローニングサイト内に 4 つの制限酵素サイト (*Mlu*I, *Sna*BI, *Cla*I, *Nsi*I) を有している。TGBp3 遺伝子領域とオーバーラップしている CP の部分領域が発現するのを防ぐため、CP の開始コドンには変異を導入してある。また、マルチクローニングサイトの下流には、完全長の CP の ORF を持つ。続いて、sGFP をインサートとして持つプラスミド 35S-sGFP (S65T) (Niwa et al., 1999) をテンプレートとして、フォワードプライマー MIEc-sGFP-F およびリバースプライマー *Sna*BI-sGFP-R を用いて PCR を行い、sGFP 遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物を *Mlu*I および *Sna*BI で処理したのち、同じく *Mlu*I および *Sna*BI で処理した pLi1vec のマルチクローニングサイトへ挿入し、pLi1-sGFP を構築した。

### (ii) pLi1-sGFPΔCP

構築手順の概要は図 4.4 に示す。pLi1-sGFP から CP 遺伝子領域を欠損させるため、pLi1-sGFP を *Sna*BI および *Spe*I で処理した。これにより生じた突出末端を Klenow Fragment (Large Fragment *E. coli* DNA Polymerase I; タカラバイオ) で埋めた後、セルフラーゲーションすることにより pLi1-sGFPΔCP を作出した。

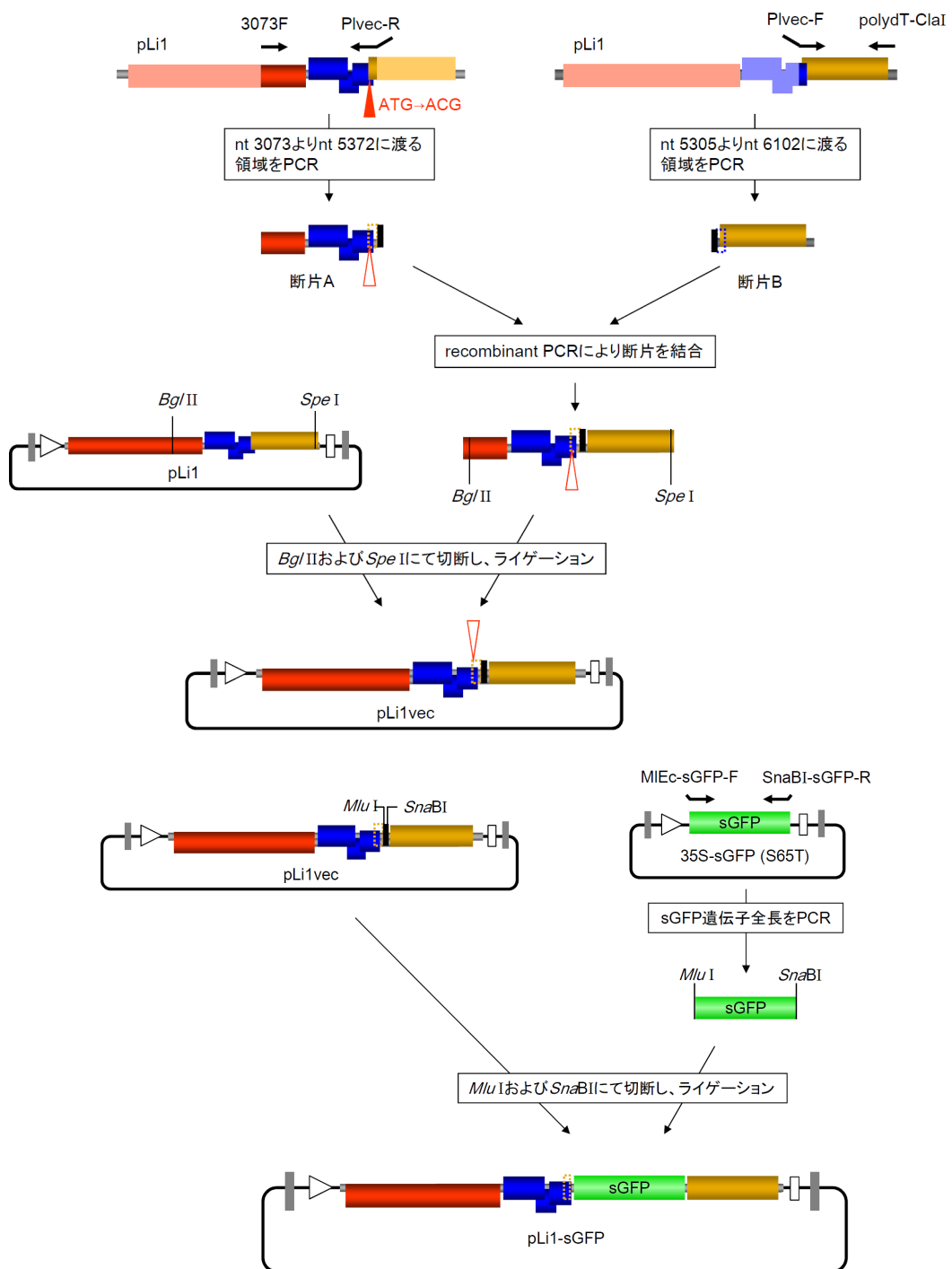


図 4.3 pLi1-sGFP 構築手順の概要

赤色のバーは RdRp 遺伝子、青色のバーは TGBp 遺伝子、黄色のバーは CP 遺伝子、黄緑色のバーは sGFP 遺伝子、黒色のバーはマルチクローニングサイトをそれぞれ表す。赤色の三角形は開始コドンを示し、白抜きの赤い三角形は変異が導入されたことを示す。プライマーの 5' 端のテンプレートに相補的でない部分は、マルチクローニングサイトを導入し、断片 A、B を重合させるために付加された配列を示す。



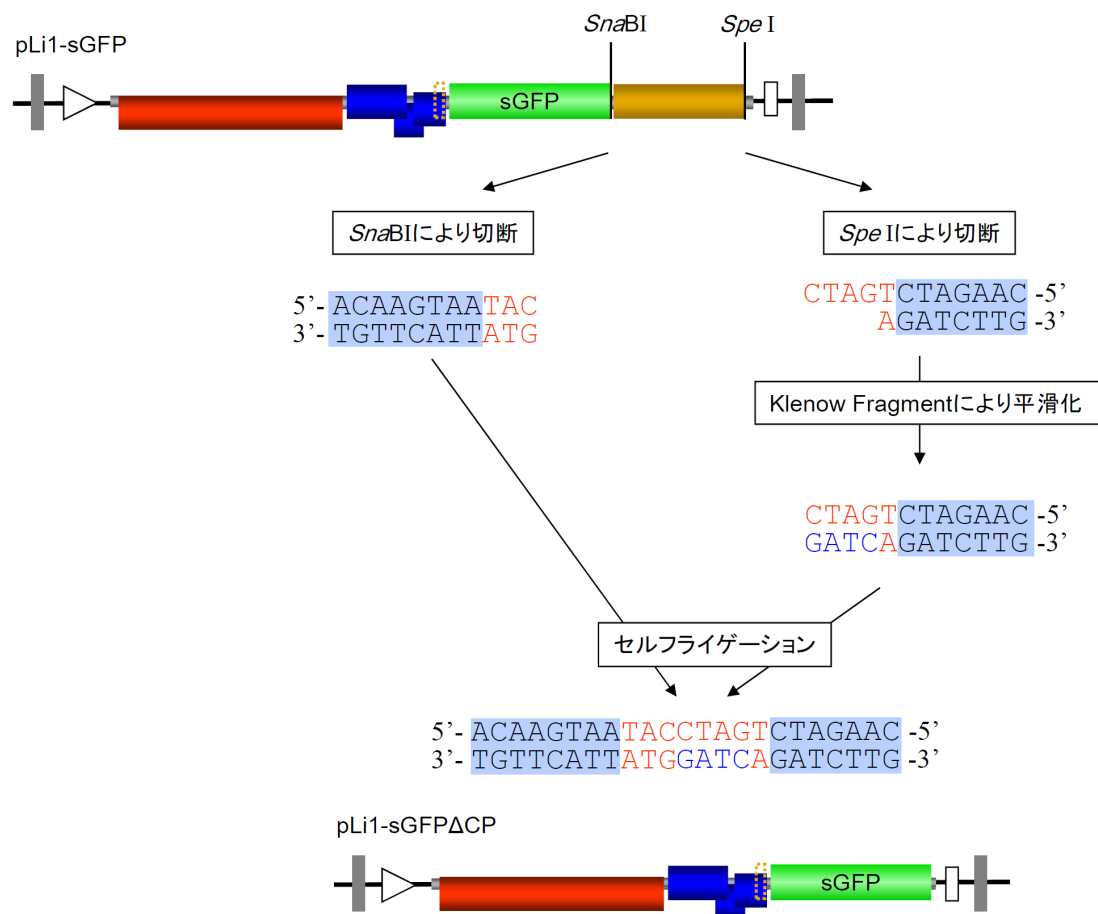


図 4.4 pLi1-sGFP $\Delta$ CP の構築

赤い文字の部分が制限酵素サイト、青色の文字の部分が Klenow Fragment により付加された塩基、青色バックスの部分が周辺配列である。

### (iii) pLi1-CPNsGFP $\Delta$ CP

構築手順の概要は図 4.5 に示す。はじめに、pLi1 をテンプレートとして、フォワードプライマー-Li-3073F およびリバースプライマー-sGFPCPN-R を用いて PCR を行い、Li1-sGFP の RdRp 遺伝子の途中から TGBp3 の終止コドンまでの領域に sGFP の開始コドン付近の領域を付加した DNA 断片 A を増幅した。また、pLi1-sGFP をテンプレートとして、フォワードプライマー-CPNsGFP-F およびリバースプライマー-sGFP-ClalR を用いて PCR を行うことで、sGFP 遺伝子および、その 5'末端に TGBp3 の終止コドン付近の領域を、さらに 3'末端に *Clal* の認識配列を付加した DNA 断片 B を得た。続いて、これらの DNA 断片をテンプレートとして混合し、Li-3073F および sGFP-ClalR を用いてリコンビナント PCR を行った。この PCR 産物を *Clal* で処理した後、突出末端を Klenow Fragment により埋め、その後に *Bgl*III で処理

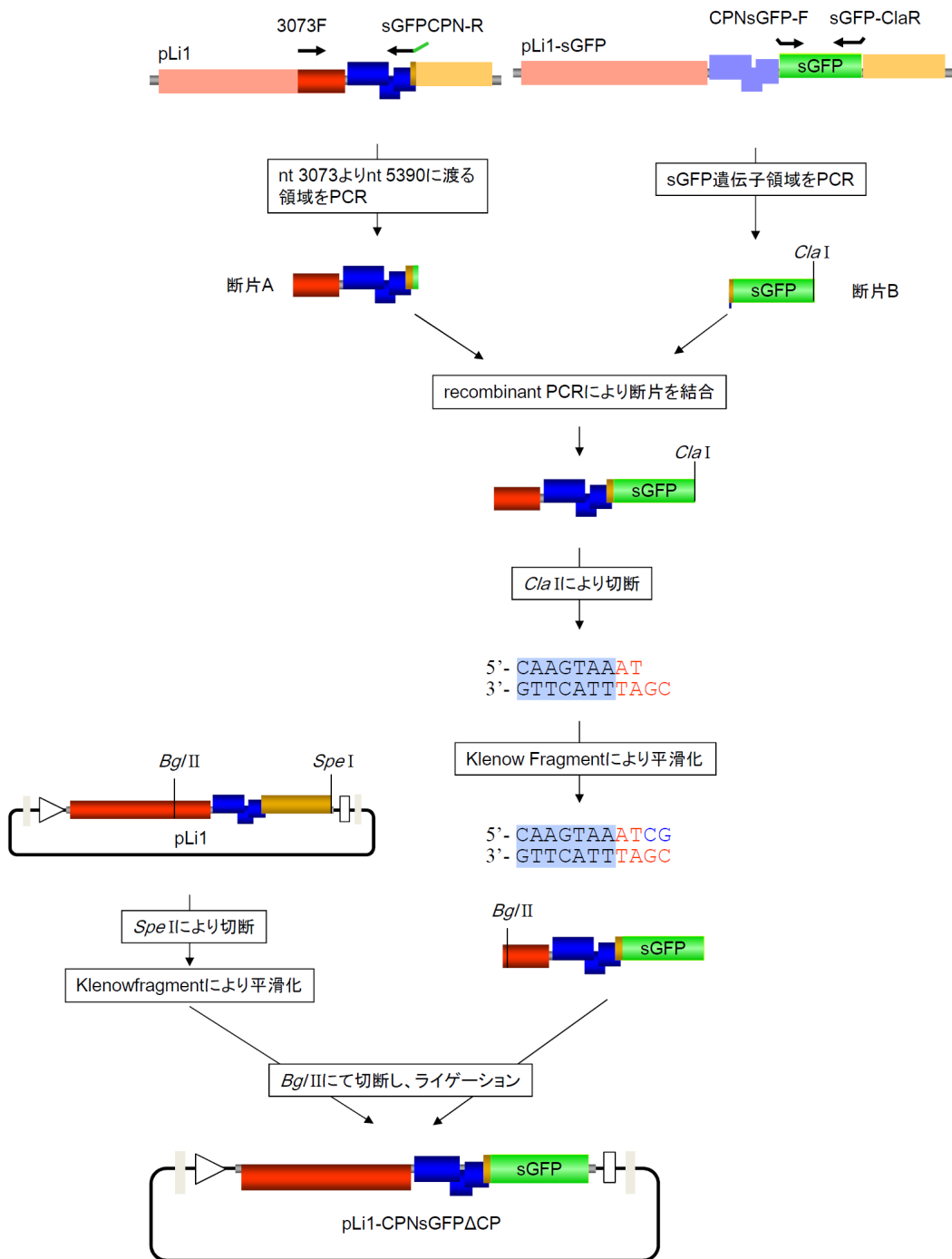


図 4.5 pLi1-CPNsGFP $\Delta$ CP の構築

赤い文字の部分が制限酵素サイト、青色の文字の部分が Klenow Fragment により付加された塩基、青色バックの部分が周辺配列である。プライマーの 5' 端のテンプレートに相補的でない部分は、制限酵素サイトを導入し、断片 A、B を重合させるために付加された配列を示す。

あとに *Bg*III で処理した。以上の制限酵素処理等を行った 2 つの DNA 断片を接続すること

した。一方で、pLi1 は *SpeI* で処理した後、突出末端を Klenow Fragment により埋め、そので、pLi1-CPNsGFP $\Delta$ CP を得た。このプラスミドは、CP 遺伝子領域のほとんどを欠損しているが、CP の N 末端領域 (CPN) をインフレームで融合した sGFP を有している。

#### (iv) pLi1-CPNsGFP-fCP、pLi1-CPNsGFP- $\Delta$ NCP

構築手順の概要は図 4.6 に示す。pLi1-CPNsGFP $\Delta$ CP をテンプレートとして、フォワードプライマー-Li-3073F およびリバースプライマー-sGFP $\Delta$ Mlu2A-R を用いて PCR を行い、RdRp 遺伝子の途中から sGFP 遺伝子の 3'末端までの領域に、さらに 3'末端に *MluI* 認識配列および FMDV の 2A 配列を付加した DNA 断片 A を増幅した。それとは別に、pLi1 をテンプレートに、プライマーセット 2APICP-F、polydT-*Clal* またはプライマーセット 2APICP28-F、polydT-*Clal* を用いて PCR 反応を行った。これにより、5'末端に 2A 配列が付加した、全長 CP (fCP) または N 末欠損 CP 遺伝子 ( $\Delta$ NCP) の開始コドンから poly (A) 配列までの領域をそれぞれ増幅した (それぞれを DNA 断片 B, C とする)。DNA 断片 A および B、または DNA 断片 A および C をテンプレートとして混合し、Li-3073F および polydT-*Clal* を用いてリコンビナント PCR を行った。得られた PCR 産物を *BglII* サイトおよび *SpeI* サイトで切断したのち、pLi1 の同一領域に挿入して pLi1-CPNsGFP-fCP または pLi1-CPNsGFP- $\Delta$ NCP を作出した。

#### (v) pLi1-CPNsGFP-mtfCP

構築手順の概要は図 4.7 に示す。このコンストラクトは、pLi1-CPNsGFP-fCP の 3'末端に存在する、CP 遺伝子の 5'末端領域にサイレントな変異を導入したものである。pLi1-CPNsGFP-fCP をテンプレートとして、フォワードプライマー-Li-3073F およびリバースプライマー-FMDVmtCP-R を用いて PCR を行い、RdRp 遺伝子の途中から 2A 配列までの領域に CP 遺伝子の 5'末端領域を付加した DNA 断片 A を増幅した。同様に pLi1-CPNsGFP-fCP をテンプレートとして、フォワードプライマー-mtCP-F およびリバースプライマー-polydT-*Clal* を用いて PCR を行い、CP 遺伝子の 5'末端領域から poly (A) 配列までの領域の DNA 断片 B を増幅した。得られた DNA 断片 A、B の混合物をテンプレートに、Li-3073F および polydT-*Clal* を用いてリコンビナント PCR を行った。得られた PCR 産物を *BglII* および *SpeI* で切断したのち、pLi1 の同一領域に挿入して pLi1-CPNsGFP-mtfCP を得た。

#### (vi) pLi1-evec

構築手順の概要は図 4.8 に示す。pLi1-CPNsGFP-mtfCP をテンプレートとして、フォワードプライマー-Li-3073F およびリバースプライマー-Li-evecR を用いて PCR を行い、RdRp 遺伝子の途中から TGBp3 にわたる領域に、さらに 3'末端にマルチクローニングサイトを付加した DNA 断片を増幅した。得られた PCR 産物を *BglII* サイトおよび *MluI* サイトで切断し、pLi1-CPNsGFP-mtfCP の該当領域へと挿入し、pLi1-evec を得た。pLi1-evec は TGBp3 と FMDV 2A 配列の間にインフレームのマルチクローニングサイト (*Clal*, *NsiI*, *SnaBI*, *MluI*) を有する。

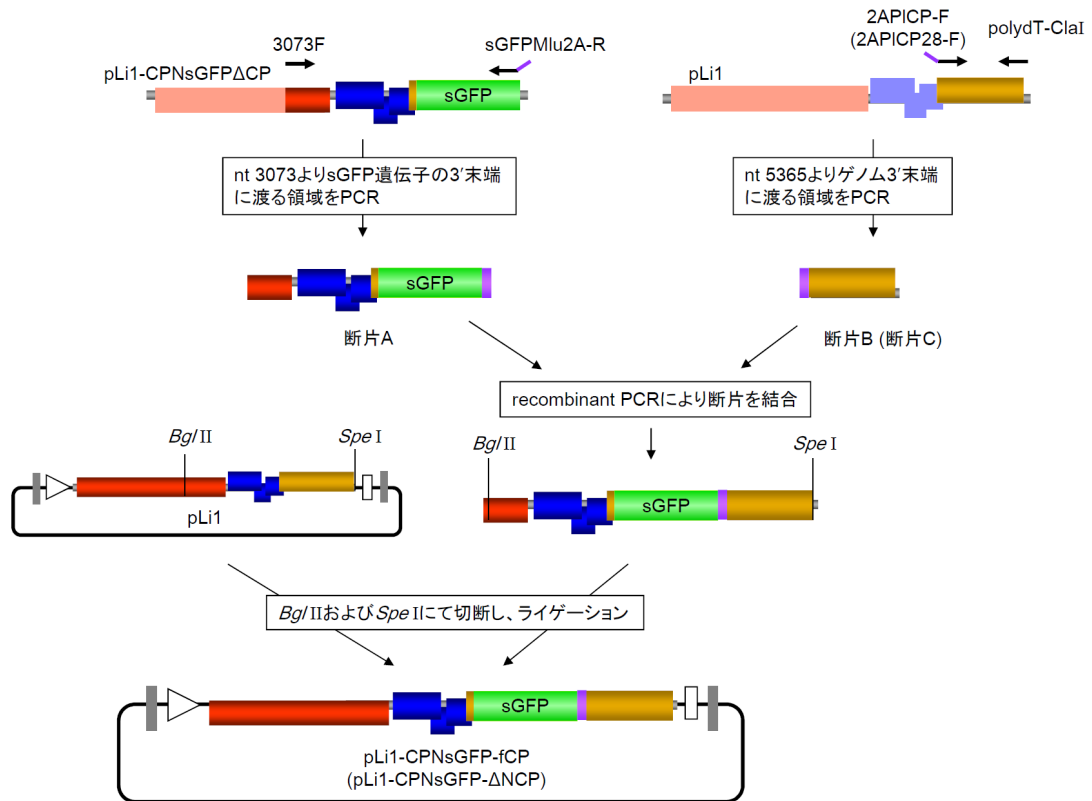


図 4.6 pLi1-CPNsGFP-fCP または pLi1-CPNsGFP-ΔNCP の構築

( ) 内は pLi1-CPNsGFP-ΔNCP の場合を示す。プライマーの 5' 端のテンプレートに相補的でない部分は、*Mlu*I 認識配列および 2A 配列を導入し、断片 A、B (または C) を重合させるために付加された配列を示す。

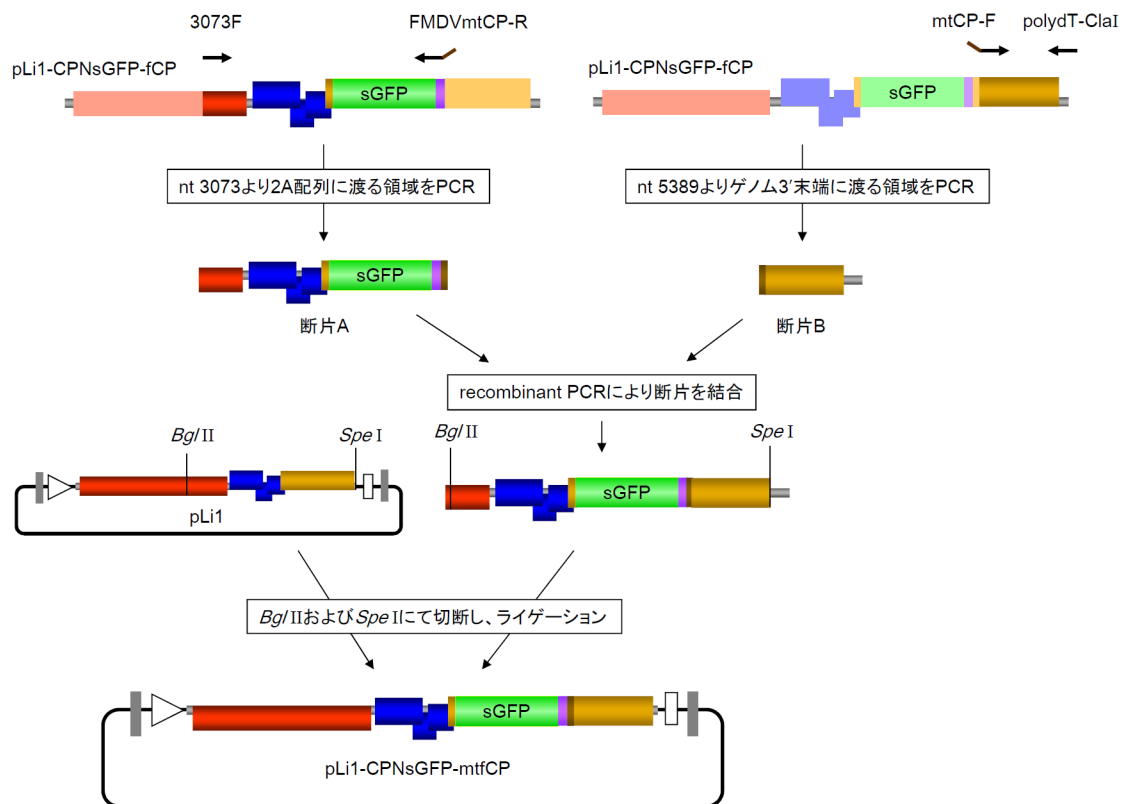


図 4.7 pLi1-CPNsGFP-mtfCP の構築

プライマーの 5' 端のテンプレートに相補的でない部分は、CP の N 末端領域に変異を導入し、断片 A、B を重合させるために付加された配列を示す。

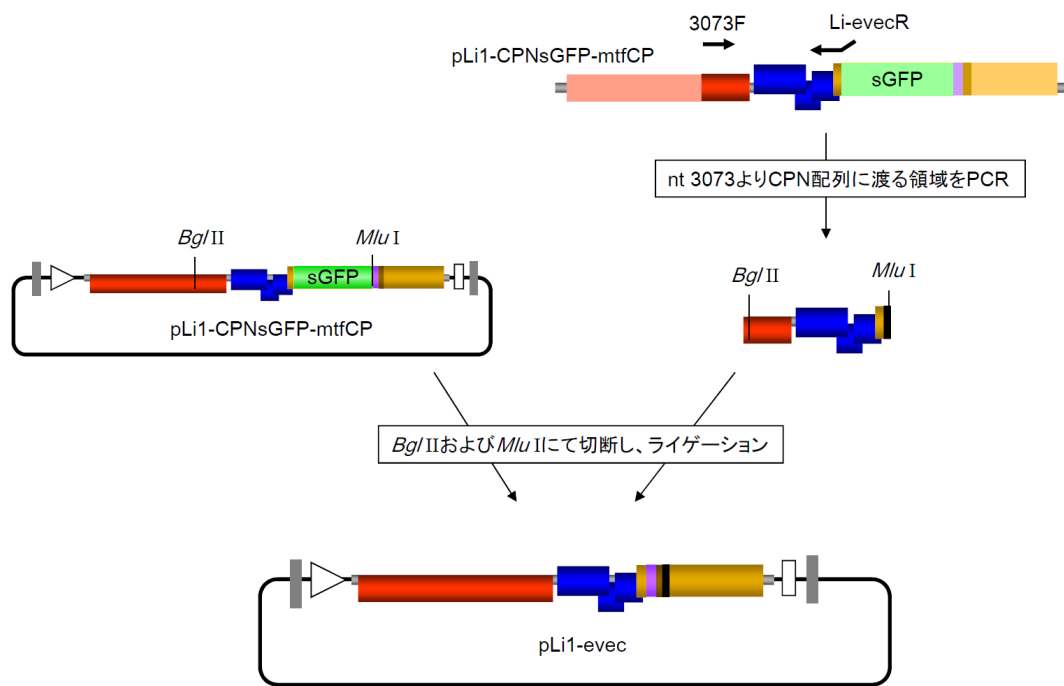


図 4.8 pLi1-evec の構築

プライマーの 5'端のテンプレートに相補的でない部分は、マルチクローニングサイトを導入するために付加された配列を示す。

(vii) pLil1-vec:nGFP と pLil1-vec:mCherry

pCAMI をテンプレートとして、フォワードプライマー-ClaI-nGFP-F およびリバースプライマー-MluI-nGFP-R を用いて PCR を行い、nGFP 遺伝子 (アクセッションナンバー M62653) を増幅した。また、ER 局在 mCherry 遺伝子配列を含むプラスミド ER-rk (Nelson et al., 2007) をテンプレートとして、フォワードプライマー-ClaI-mCh-F およびリバースプライマー-MluI-mCh-R を用いて PCR を行い、mCherry 遺伝子を増幅した。続いて、これらの nGFP 遺伝子および mCherry 遺伝子の DNA 断片を *ClaI* および *MluI* で処理した pLil1-vec へ挿入し、pLil1-vec:nGFP および pLil1-vec:mCherry を得た。

### 2.3 蛍光観察

各種 GFP 挿入ウイルスを接種した植物体全体および葉の観察には、UV ハンドライト B-100 BLACK-RAY long wave ultraviolet (UV) lamp (Ultraviolet Products) を用いて行った。また、GFP 蛍光の撮影には黄色フィルターを装着した Canon Digital Still Camera model EOS Kiss Digital を用いた。2 種のタンパク質の同時発現実験において、GFP 蛍光および mCherry 蛍光の詳細な観察には、実体蛍光顕微鏡 (MZ16F, Leica Microsystems) および共焦点レーザー顕微鏡 (TCS SP5, Leica Microsystems) を用いた。また、全ての画像の処理には Adobe Photoshop CS4 software (Adobe Systems) を用いた。

### 2.4 ウェスタンブロット解析

タンパク質サンプルは、サンプリングした *N. benthamiana* の葉を、液体窒素により凍結摩砕し、5 倍量の PBS バッファー (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) を加えて磨砕した後、遠心をして上清を 5  $\mu$ l とり、SDS loading バッファーと混ぜて total 20  $\mu$ l とし、100°C、5 分間加熱することで準備した。準備したタンパク質サンプルは、12%のアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により泳動した。泳動後、TRANSBLOT SD (BIO-RAD) を用いたセミドライ法により、タンパク質をゲルから PVDF メンブレン (Immobilon-P; Millipore) にブロットした。ブロット後、このメンブレンを Blocking Buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5、150 mM NaCl、0.1% (v/v) Tween20、5% (v/v) スキムミルク) を用いてブロッキングした後、1 次抗体として anti-GFP mouse monoclonal antibody (clone 7.1 と clone 13.1、Roche Diagnostics)、2 次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG ヤギ抗体 (GE Healthcare) を用いて抗原抗体反応を行った。シグナルの検出には、ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) を用い付属のプロトコルの通り行い、luminescent image analyzer LAS-1000plus 及び Image Gauge software ver. 3.45 (Fujifilm)を用いた。



## 2.5 RNA 抽出および RT-PCR

植物組織を液体窒素中で摩砕し、ISOGEN（ニッポンジーン）を用いて全 RNA を抽出した。抽出操作はキットに添付されているプロトコルに従った。70%エタノールで塩を除去したのち、20  $\mu$ l の MilliQ 水に溶かした。RNA 濃度は、100 倍希釈溶液の 260 nm における吸光度を測定することにより決定した。

RT-PCR ではまず、全 RNA をテンプレートとして、Li1 ゲノムのうち、3'末端に対応するリバースプライマー-polydT-ClaI を用いて、AMV transcriptase (Life Technologies) により逆転写反応を行った。この逆転写反応の産物をテンプレートとして、フォワードプライマー TGB2F およびリバースプライマー-Li-5575R を用い、KOD -Plus- (TOYOBO) により PCR 反応を行った。反応終了後、0.7%アガロースゲル電気泳動法により、目的の DNA 断片が増幅されているかを確認した。RT-PCR の操作は、それぞれのキットに添付されているプロトコルに従った。

## 2.6 ノーザンブロット解析

RNA サンプルは、植物組織から 2.5 項と同様の手順で全 RNA を抽出した後、エタノール沈殿を行うことで準備した。1 サンプルあたり 6  $\mu$ g の全 RNA を使用し、ホルムアルデヒド変性 1%アガロースゲルにより、100 V で 30 分間電気泳動を行った。RNA 泳動量のコントロールとして、泳動後にエチジウムブロマイド染色を行い、UV 照射下でのリボソーム RNA の染色像を指標に、各サンプル間で RNA 量が揃っていることを確認した。その後、泳動した RNA を Turboblotter system (Schleicher & Schuell) を用いて Nyron Membrane positively charged (Roche Diagnostics) に転写し、UV クロスリンクによってメンブレンに固定した。ブロッキング後のメンブレンを  $2\times$ SSC (300 mM NaCl, 30 mM  $C_6H_5Na_3O_7\cdot 2H_2O$ , pH 7.4) を用いて洗浄し、DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics) でプレハイブリダイゼーションを行った。その後、あらかじめ DIG ラベルした RNA プローブを 3,000 倍希釈、68°C で 12 時間メンブレンにハイブリダイゼーションさせた。次いで、メンブレンを洗浄液 1 ( $2\times$ SSC, 0.1 % SDS) および洗浄液 2 ( $0.2\times$ SSC, 0.1 % SDS) を用いて洗浄し、DIG Wash and Block Buffer Set (Roche Diagnostics) のブロッキングバッファーでブロッキング後、Anti-Digoxigenin-Fab fragment 抗体を 10,000 倍希釈したものを室温で 1 時間ハイブリダイゼーションさせた。Wash バッファーで洗浄した後、CDP-star (New England Biolabs) を用いて検出した。CDP-star を用いた化学発光の検出には LAS-1000 (Fujifilm) を使用した。GFP の mRNA を検出するための RNA プローブは、GFP 遺伝子の部分配列 (nt 448-717) を pGEM-TEasy (Promega) にクローニングしたプラスミドを NcoI 処理によって直鎖化し、SP6 ポリメラーゼと DIG Northern Starter Kit (Roche Applied Science) を用いて *in vitro* 転写を行うことによって作製した。

表 4.1 本研究で用いたプライマーの一覧

プライマー	配列 (5' to 3')
Li-3073F	CCATCAATGCACGCCTGACC
Plvec-R <sup>ab</sup>	ATGCATATCGATTACGTAACGCGTTCAGAGGTCGGAGCTTGTTGAGTGC <b>CGTGGT</b>
Plvec-F <sup>b</sup>	ACGCGTTACGTAATCGATATGCATCCCACCCTAGAGGCTTAAGTT
polydT-ClaI <sup>b</sup>	CTCCCATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
MIec-sGFP-F <sup>b</sup>	AAACGCGTGAATTCATGGTGAGCAAGGGCGAGG
SnaBI-sGFP-R <sup>b</sup>	AAATACGTATTACTTGTACAGCTCGTCCATGC
sGFPCPN-R <sup>b</sup>	CTCCTCGCCCTTGCTCACCATCGGATCCTCAGAGGTCGGAGCTTGG
CPNsGFP-F <sup>b</sup>	CCAAGCTCCGACCTCTGAGGATCCGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
sGFP-ClaR <sup>b</sup>	AAATCGATTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC
sGFPMlu2A-R <sup>bc</sup>	acgtctcccgaagcttaagaaggtcaaaattACGCGTCTTGTACAGCTCGTCCATGCC
2APICP-F <sup>cd</sup>	agcttgcggggagacgtcgagtgccaaccctgggcccgaCTCAACCAAGCTCC
2APICP28-F <sup>ce</sup>	agcttgcggggagacgtcgagtgccaaccctgggcccgaCGCCCTCAACGCGATG
FMDVmtCP-R <sup>f</sup>	<u>GGATGTGGGTGCGGTATT</u> CAGACCGGGCCCAGGGTTGGACTC
mtCP-F <sup>f</sup>	<u>GGTCTGAATACCGCACCCACATCCGACGCCCTCAACGCGATG</u>
Li-evecR <sup>b</sup>	TTTACGCGTTACGTAATGCATATCGATGGGATCCTCAGAGGTCGG
ClaI-nGFP-F <sup>b</sup>	TTTATCGATATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTT
MluI-nGFP-R <sup>b</sup>	TTTACGCGTTTTGTATAGTTCATCCATGC
ClaI-mCh-F <sup>b</sup>	TTTATCGATATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
MluI-mCh-R <sup>b</sup>	TTTACGCGTCTTGTACAGCTCGTCCATGC
TGB2F	ATGTCCGGAGCCCACCAC
Li-5575R	GGTCCGCTGAGGGTGACGAA

<sup>a</sup> 太字は変異が挿入された開始コドン(ATG→ACG)の相補鎖にあたる塩基を表す

<sup>b</sup> 大文字のイタリックは制限酵素サイトを表す

<sup>c</sup> 小文字は FMDV の 2A 配列の部分配列を表す

<sup>d</sup> 下線が引かれた小文字は CP の 2 番目のアミノ酸に相当するコドンを表す

<sup>e</sup> 小文字のイタリックは CP の 10 番目のアミノ酸に相当するコドンを表す

<sup>f</sup> 下線が引かれた大文字は CP の始めの 10 アミノ酸に導入された変異を表す

### 3. 結果

#### 3.1 PLAMV を利用したウイルスベクターの構築

まず、既存の *Potexvirus* 属ウイルスのベクターと同様の方法で、CP のサブゲノム RNA プロモーターを、本来のサブゲノム RNA プロモーターの直下流で重複させたコンストラクト pLi1vec に、マーカータンパク質である sGFP を pLi1vec の TGBp3 と CP の間のマルチクロニングサイトに挿入した (図 4.3)。このコンストラクト pLi1-sGFP は、外来遺伝子 (sGFP) (Niwa et al., 1999) を自身の開始コドンから発現させるため、TGBp3 コード領域に存在する CP の本来の開始コドンに変異を導入した (AUG→ACG)。pLi1-sGFP を *N. benthamiana* に接種したところ、接種葉および上葉において GFP 蛍光は見られなかったが、接種後約 7 日で上葉において野生型の Li1 と同様の壊死病徴が見られた (Ozeki et al., 2006)。上葉から RNA を抽出し、RT-PCR を行ったところ、特異的なバンドが検出され、上葉におけるウイルス感染が確認された。増幅産物の塩基配列のシーケンスを行ったところ、配列は野生型の Li1 と全く同一であり、このことから、sGFP 遺伝子はウイルスゲノムから速やかに抜け落ちていることが示唆された。これは、サブゲノム RNA プロモーター領域から TGBp3 の終止コドンに至る 86 塩基を重複させたことにより、相同組換えが生じたことが原因であると考えられた。また、重複させるサブゲノム RNA プロモーター配列を、推定コア領域である 72 塩基に絞った場合も、同様に sGFP が速やかに抜け落ち、GFP 蛍光は観察されなかった。PVX を利用した既報の発現ベクターは、Li1-sGFP と同じゲノム構造をとっているにも関わらず外来遺伝子を効率的に発現できるため (Baulcombe et al., 1995)、同属ウイルスにおいても、ウイルスゲノムの可塑性あるいは安定性が異なっている可能性が考えられた。

#### 3.2 外来遺伝子の翻訳開始点の最適化

前項で作出したベクターを改良するため、まずは挿入遺伝子の抜け落ちの影響を排除した上で、sGFP の発現が可能かどうかを調べることにした。そこで、pLi1-sGFP の sGFP の終止コドンの下流に存在する CP のサブゲノムプロモーターおよび ORF 全体を削った変異ウイルス pLi1-sGFP $\Delta$ CP を作製した。重複部分を除くことにより、ウイルス感染時に生じる相同組換えを防ぎ、その結果生じる sGFP 遺伝子の抜け落ちを防ぐことができると考えた。このウイルスは CP を欠損しているため細胞間移行はできないが、接種領域で GFP を発現する可能性が考えられたため、*N. benthamiana* で接種試験を行った。その結果、インフィルトレーションした領域において、sGFP の蛍光はほとんど観察されなかった (図 4.9 a)。しかし、RNA サイレンシングの影響を排除することで外来遺伝子の発現量を上昇させるため、tomato bushy stunt virus の RNA サイレンシングサブプレッサーである p19 を共発現させた場合 (Voinnet et al., 2003)、ウエスタンブロット解析では sGFP はほとんど検出されなかったが、

肉眼による観察では、GFP 蛍光がわずかに確認された (図 4.9 a, b)。さらに、p19 共発現時には、sGFP 特異的プローブを用いたノーザンブロット解析によって sGFP を発現するサブゲノム RNA が検出され、転写も起こっていることが明らかとなった (図 4.9 c)。

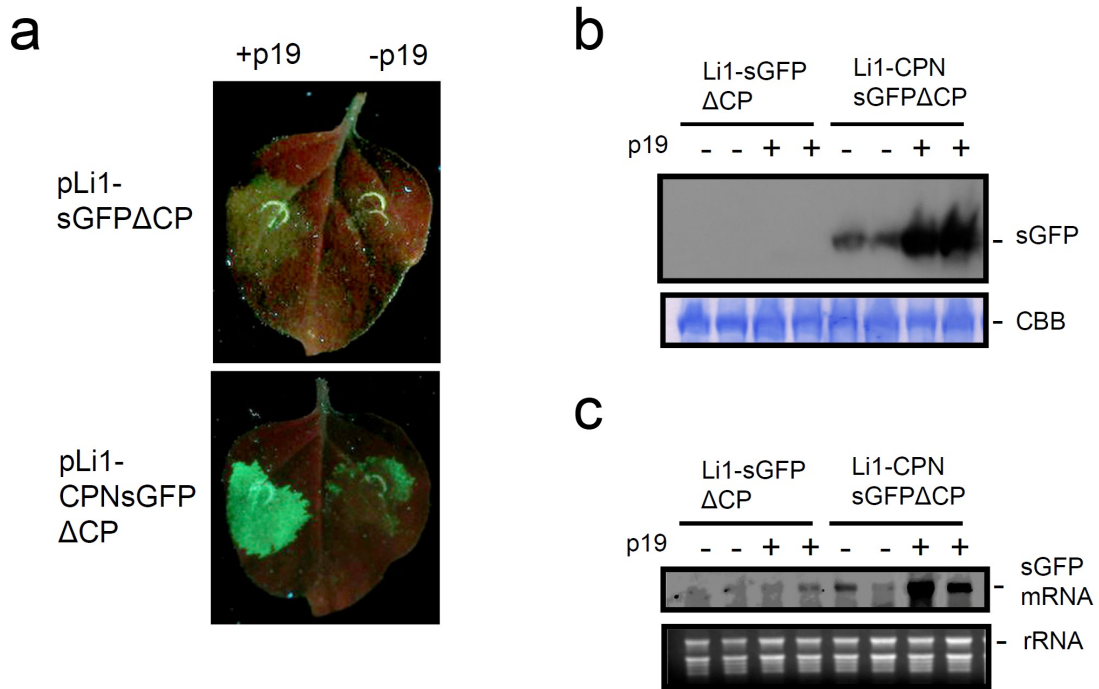


図 4.9 CP 欠損 PIAMV ベクターにおける GFP 発現量の比較

(a) pLi1-sGFP $\Delta$ CP (上パネル) または pLi1-CPNsGFP $\Delta$ CP (下パネル) をアグロインフィルトレーションした *N. benthamiana* の葉における GFP 蛍光の観察。葉の左側は p19 共発現時 (+p19)、右側は単独発現時 (-p19)。(b) ウェスタンブロット解析による、pLi1-sGFP $\Delta$ CP または pLi1-CPNsGFP $\Delta$ CP をアグロインフィルトレーションした *N. benthamiana* の葉における GFP 発現量の比較。-は単独発現時、+は p19 共発現時を示す。ローディングコントロールには RubisCO タンパク質の Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色像を示した。(c) ノーザンブロット解析による sGFP の mRNA 蓄積量の比較。RNA のローディングコントロールとして、rRNA のエチジウムブロマイド染色像を示した。

以上のことから、pLi1-sGFP $\Delta$ CP において sGFP の発現量が低い原因として、TGBp3 内に存在する CP の開始コドンを変異させ、TGBp3 の ORF の直下流に人工的に sGFP の開始コドン挿入したことで、開始コドンの前後配列が翻訳開始に不適當になった可能性が考え

られた。そこで、sGFP の発現を上昇させるため、Li1 由来の CP 開始コドンを残すことで、TGBp3 遺伝子とオーバーラップする CP の N 末端部分 (CPN とする) は翻訳されるようにし、それとフレームが合うように TGBp3 の終止コドンの下流に sGFP 遺伝子を融合させたコンストラクト pLi1-CPNsGFP $\Delta$ CP を構築した。pLi1-CPNsGFP $\Delta$ CP の接種試験の結果、接種領域においては、p19 と共発現しなくとも sGFP の蛍光が肉眼で観察され、p19 と一緒にインフィルトレーションした場合にはより強い GFP 蛍光が確認できた (図 4.9 a)。ウエスタンブロット解析によっても sGFP の発現が確認された (図 4.9 b)。さらに、pLi1-CPNsGFP $\Delta$ CP は pLi1-sGFP $\Delta$ CP よりも多くのサブゲノム RNA を発現しており (図 4.9 c)、開始コドン付近の配列がサブゲノム RNA の安定性に影響する可能性が考えられた。これらの結果より、TGBp3 の ORF 内に存在する CP の本来の開始コドンは、外来タンパク質の発現に最適であることが示唆された。

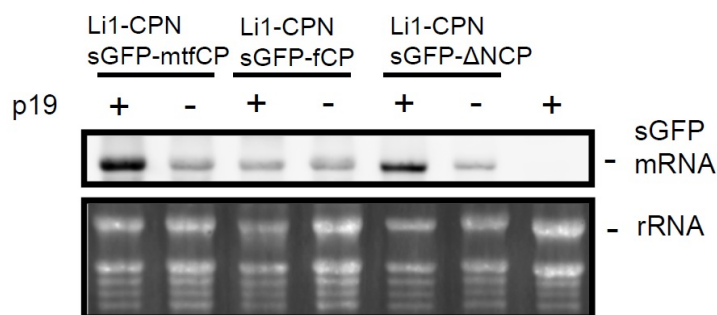
### 3.3 2A 配列による GFP と外被タンパク質の融合

次に、植物体に全身感染する PIAMV ベクターを構築するために、*Potexvirus* 属ウイルスの細胞間移行および全身移行に必要な CP を発現させるよう (Ozeki et al., 2009)、前項までに示した結果を踏まえてウイルスベクターをさらに改変することにした。既に述べた結果から、PIAMV においては、外来遺伝子を発現させるためサブゲノム RNA のプロモーターを重複させると、外来遺伝子の脱落は避けられないと考えられた。またいくつかの *Potexvirus* 属ウイルスのベクター開発の過程で、外来遺伝子の不安定性が報告されている (Avesani et al., 2007; Chung et al., 2007; Sempere et al., 2011)。そこで、sGFP の C 末端側に自己切断配列である FMDV の 2A 配列を介して CP 全長を融合させた、sGFP-2A-CP 融合タンパク質を発現させることを考えた。この 2A ペプチドの介在により、sGFP-2A-CP 融合タンパク質が翻訳されたのちに、自己切断が起こり単独の CP が発現されると考えられる。そこで pLi1-CPNsGFP $\Delta$ CP の sGFP の C 末端に 2A 配列および CP をインフレームで融合させた、pLi1-CPNsGFP-fCP を構築した。この変異ウイルスを *N. benthamiana* に接種したところ、接種葉、上位葉とも GFP 蛍光は認められず、接種 7 日後に上位葉において壊死病徴が観察された。sGFP を発現するサブゲノム RNA は接種葉で検出されたが (図 4.10 a)、上位葉から抽出した RNA をテンプレートとして行った RT-PCR の増幅産物のシーケンスにより、この変異ウイルスは sGFP 配列が抜け落ち、野生型の Li1 の配列に復帰変異していたことが明らかとなった。この sGFP 配列の抜け落ちは、TGBp3 とオーバーラップしている CP の N 末端 10 アミノ酸 (NCP) にあたる 30 塩基の塩基配列が、2A 配列の下流に融合した CP 遺伝子の 5'末端の 30 塩基と一致していることにより生じた相同組換えが原因であると考えられた。

PVX においては、CP の N 末端の 21 アミノ酸の欠失は感染性に影響しないと報告されている (Lico et al., 2006)。そこで、塩基配列の重複を解消する目的で、pLi1-CPNsGFP-fCP で 2A 配列の下流に融合した CP の、N 末端 9 アミノ酸を欠損させたコンストラクト

pLi1-CPNsGFP- $\Delta$ NCP を構築した。この変異ウイルスを *N. benthamiana* に接種したところ、接種葉において GFP 蛍光が観察され、p19 非存在下においても sGFP のサブゲノム RNA はノーザンブロット解析により検出できるまで蓄積した (図 4.10 a)。しかしながら、上位葉においては GFP 蛍光が観察されず、Li1-CPNsGFP- $\Delta$ NCP は植物体に全身感染できないと考えられた。そこで、このウイルスが細胞間移行できるか否かを GFP 蛍光の拡がりを指標にして調べるため、pLi1-CPNsGFP- $\Delta$ NCP を形質転換したアグロバクテリウムの菌液を希釈し、

a



b

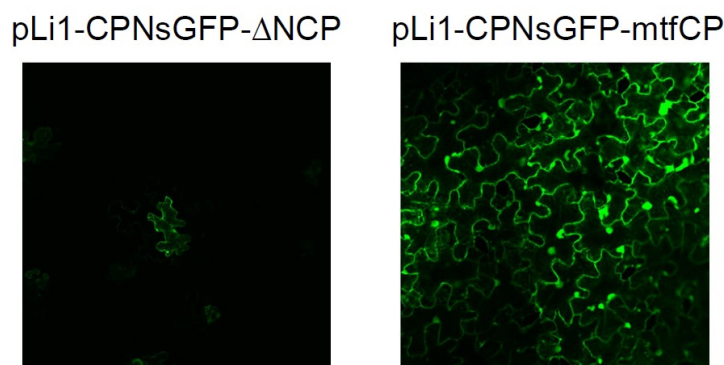


図 4.10 各種 GFP-2A-CP 融合タンパク質を発現する、変異 PIAMV ベクターにおける GFP 発現量の比較 (a) ノーザンブロット解析による sGFP の mRNA 蓄積量の比較。-は単独発現時、+は p19 共発現時を示す。RNA のローディングコントロールとして、rRNA のエチジウムブロマイド染色像を示した。(b) pLi1-CPNsGFP $\Delta$ NCP (左パネル) または pLi1-CPNsGFP-mtfCP (右パネル) をアグロインフィルトレーションした *N. benthamiana* の葉の表皮細胞における GFP 蛍光の観察。

(600nm における吸光度  $O.D._{600}=0.0002$ )、接種試験を行った。その結果、接種 1 日目または 2 日目において、一細胞に相当する GFP 蛍光のスポットが観察された (Ozeki et al., 2009)。接種後 4 日目においても、この GFP 蛍光はほぼ一細胞にとどまり、拡大することはなかった (図 4.10 b)。従って、Li1-CPNsGFP- $\Delta$ NCP が全身感染できなかったのは、細胞間移行能が欠損しているためであると考えられた。このことは、PIAMV においては CP の N 末端から 3 番目のアミノ酸 (Leu-3) が細胞間移行に必要であるという報告と一致している (Ozeki et al., 2009)。このことから、ウイルスの全身感染には N 末欠損 CP ではなく CP 全長が必要であると考えられたが、上記のように、全長 CP を発現する sGFP 発現ウイルスベクター pLi1-CPNsGFP-fCP では、sGFP 遺伝子が抜け落ちてしまう。そこで、sGFP の抜け落ちを引き起こす相同組換えを防ぐために、pLi1-CPNsGFP-fCP の 2A 配列直下の、CP の N 末端 10 アミノ酸に相当する塩基配列に同義置換を入れ、pLi1-CPNsGFP-mtfCP を構築した。この変異ウイルスの接種試験を行ったところ、Li1-CPNsGFP- $\Delta$ NCP とは対照的に、Li1-CPNsGFP-mtfCP の GFP 蛍光のスポットは接種後 4 日で複数細胞へ拡大し、この変異ウイルスは細胞間移行することが明らかとなった (図 4.10 b)。さらに、接種後 7 日で上位葉においても強い GFP 蛍光が観察された。また上位葉では、モザイク病徴や時おり壊死病徴が見受けられたが、野生型の Li1 よりもマイルドな病徴であった。また、上位葉から抽出した RNA をテンプレートとして行った RT-PCR の増幅産物のシーケンスの結果、このウイルスは CP の N 末端に導入した同義置換変異および sGFP 遺伝子を保持しており、予期せぬ塩基変異を生じていなかった。

以上の知見を踏まえ、ウイルスベクターへの目的遺伝子配列の挿入を容易にするため、pLi1-CPNsGFP-mtfCP の sGFP の部分に、マルチクローニングサイトを付加したベクター pLi1-evec を作製した。このベクターは、制限酵素を用いて目的遺伝子配列を挿入する際に、CPN と 2A 配列にフレームを合わせて導入することで、ウイルスベクターにより外来遺伝子を容易に発現させることが可能となった。

### 3.4 PIAMV ベクターおよび PVX ベクターによる GFP 発現パターンの比較

続いて、前項で作製した pLi1-evec を用いて、既存の PVX ベクターとの比較を行った。まず、pLi1-evec のマルチクローニングサイトに nGFP を挿入して、pLi1-evec:nGFP を作出し、接種試験を行った。比較として、現在広く用いられている PVX ベクターに、nGFP 遺伝子を挿入した pCAMI (Takahashi et al., 2006) を用いた。pCAMI は、pLilevec:nGFP と同様に、pCAM1301 をベースとして構築されており、また TGBp3 の直下に挿入された nGFP の C 末端には、2A 配列および PVX の CP が接続され融合タンパク質として発現する。pLi1-evec:nGFP と pCAMI をアグロインフィルトレーションによって *N. benthamiana* に接種したところ、接種後 7 日目において pLi1-evec:nGFP を接種した株では、pCAMI を接種した株に比べて GFP 蛍光の強さや広がりは弱かった。しかし、接種 30 日後になると、pCAMI を

接種した株では、RNA サイレンシングまたは GFP 遺伝子の抜け落ちにより、特に上位葉において GFP 蛍光が減少した（図 4.11 下パネル左）。一方、pLi1-evec:nGFP を接種した株では、接種 30 日後においても植物体全身で安定して GFP 蛍光を発現していた（図 4.11 下パネル右）。さらには、この上位葉を接種源として継代接種を行ったところ、少なくとも 7 代継代しても同様に強い GFP 蛍光が認められた。PIAMV ベクターと PVX ベクターに見られた GFP 遺伝子発現の安定性の違いは、PIAMV の RNA サイレンシング抑制能が PVX と比べて強いこと（Senshu et al., 2009）に起因する可能性が考えられる。

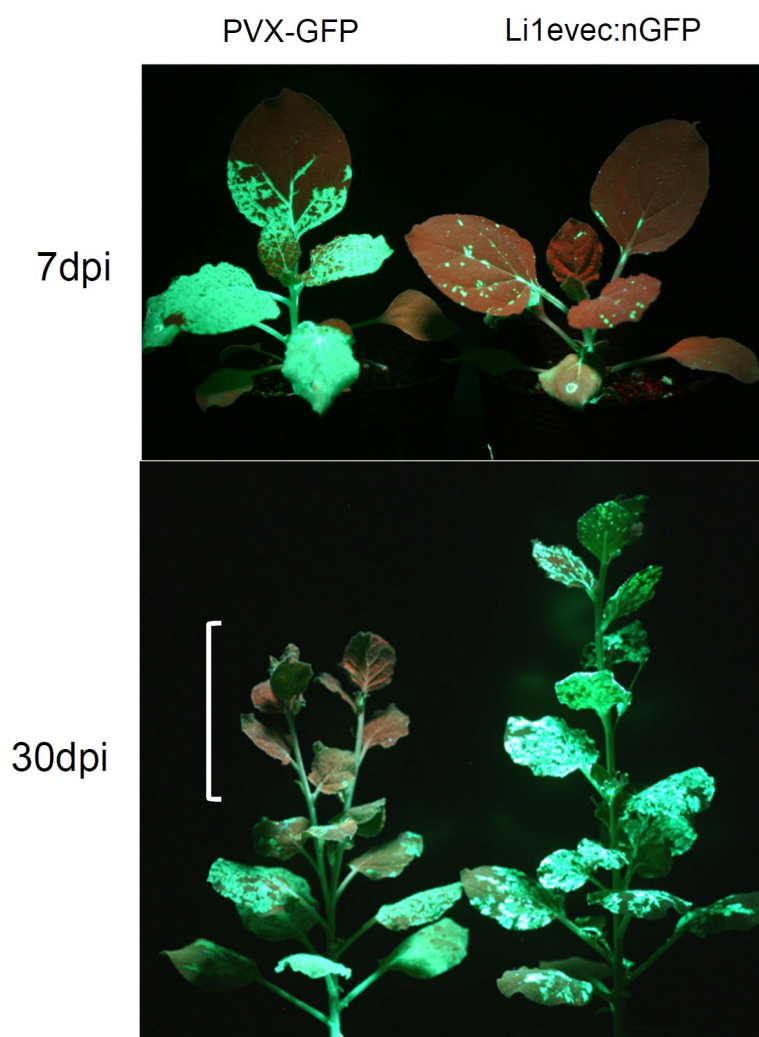


図 4.11 PVX-GFP (pCAMI, 左側) または PIAMV-GFP (pLi1-evec:nGFP 右側) を接種した *N. benthamiana* における GFP の発現

写真は接種後 7 日 (days post inoculation; dpi) および 30 日に撮影した。白色のかっこは GFP 蛍光が減退した葉を示す。



### 3.5 PIAMV ベクターおよび PVX ベクターの RNA サイレンシング誘導能の比較

前項の結果より、本研究で作出した PIAMV ベクターは、PVX ベクターよりも RNA サイレンシング誘導能が低い可能性が考えられた。この可能性について検証するため、PIAMV ベクターと PVX ベクターの RNA サイレンシング誘導能を比較することとした。予め GFP バリエーションである mGFP5 が形質転換されている *N. benthamiana* (ライン名: 16c、Ruiz et al., 1998) に、Li1-evec:nGFP と pCAMI をアグロインフィルトレーションし、ウイルスと 16c に由来する GFP 蛍光の観察を行った。ウイルスベクターのもつ nGFP 遺伝子の配列は mGFP5 と 90%以上の高い相同性を持ち、特に 5'および 3'末端領域は全く同一配列である。従って、nGFP 遺伝子を持つウイルスベクターは、感染によって 16c 植物で mGFP5 遺伝子の RNA サイレンシングを誘導しうると考えられる。接種後 10 日までに、両方のウイルスベクターを接種した植物で、上葉において mGFP5 の RNA サイレンシングが誘導され、GFP 蛍光が消失するのが観察された (図 4.12, a と d)。しかし、GFP 蛍光の消失の程度は 2 種のウイルスベクターで異なっていた。すなわち、Li1-evec:nGFP を接種した植物の上葉では、GFP 蛍光の消失は葉脈に沿った領域に限られていた (図 4.12, e と f)。さらに、葉脈以外の部分において斑点状に、ウイルス感染によると思われる強い GFP 蛍光が観察された (図 4.12 e)。一方、pCAMI を接種した植物の上葉では葉全体の GFP 蛍光がほぼ完全に消失していた (図 4.12, b と c)。このことは、PIAMV ベクターが PVX ベクターよりも強い RNA サイレンシング抑制能を持つことを示唆しており、このことは PIAMV ベクターによる植物体全体での外来遺伝子の安定した発現に寄与していると考えられる。

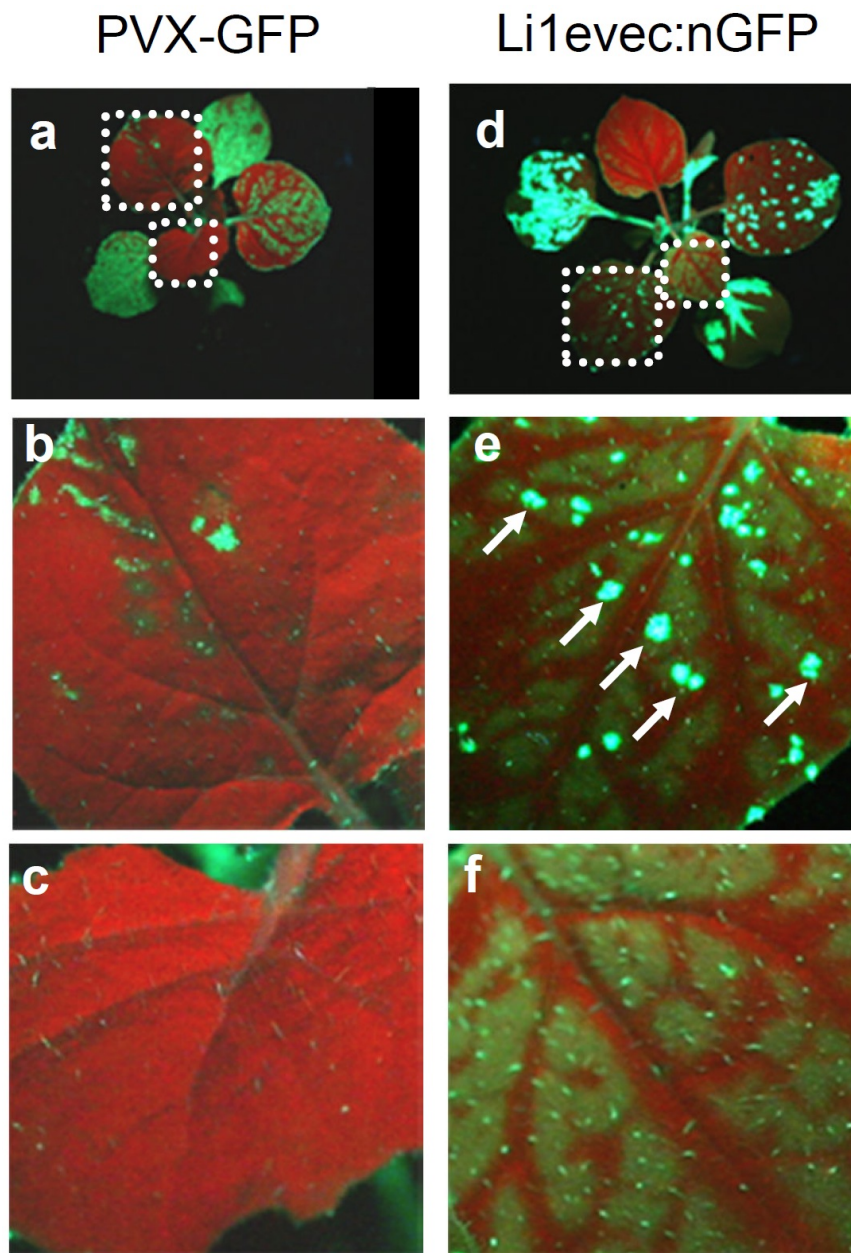


図 4.12 PVX-GFP または PIAMV-GFP を接種した GFP 形質転換 *N. benthamiana* (ライン 16c) における GFP の発現

(a) PVX-GFP を接種した 16c の全体像。点線で囲まれた部分は b および c で観察した領域を示す。(b および c) a において点線で囲まれた部分の拡大写真。(d) PIAMV-GFP を接種した 16c の全体像。点線で囲まれた部分は e および f で観察した領域を示す。(e および f) d において点線で囲まれた部分の拡大写真。e の矢印は Li1-*evec*:nGFP に由来する強い GFP 蛍光のスポットを示す。いずれも接種後 10 日の観察結果を示した。

### 3.6 シロイヌナズナへの接種試験

PIAMV ベクターが他のモデル植物にも感染できるかを調べるため、pLi1-evec:nGFP をシロイヌナズナに接種した。接種方法としては、pLi1-evec:nGFP をアグロインフィルトレーション接種した *N. benthamiana* の GFP 蛍光が見られる上位葉を接種源に、シロイヌナズナへの機械接種を行った。接種したシロイヌナズナにおいては、接種後 21 日までに、ロゼット葉、カウリン葉、ステム、花器官を含む全器官で GFP 蛍光が確認された (図 4.13)。また、GFP 蛍光を示した上位葉を接種源として継代接種を行ったところ、少なくとも 4 代継代しても同様に強い GFP 蛍光が認められた。

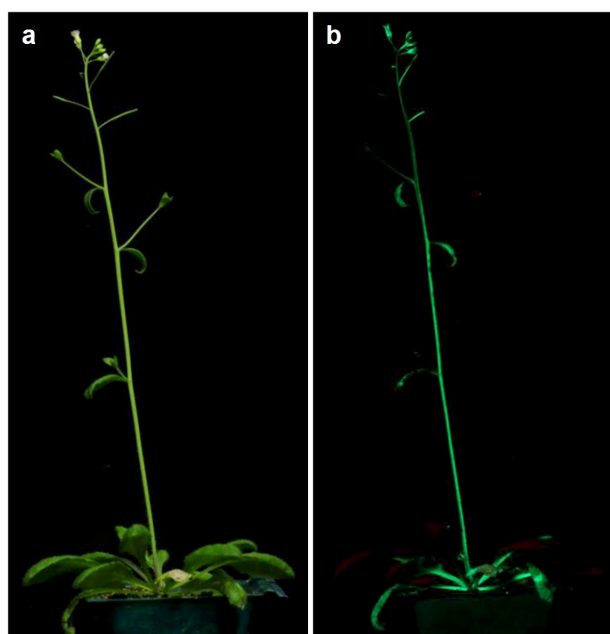


図 4.13 PIAMV-GFP ベクター (pLi1-evec:nGFP) を接種したシロイヌナズナにおける GFP の発現  
(a) 通常の可視光下における PIAMV-GFP 接種シロイヌナズナの全体像。(b) UV 照射下における全体像。  
いずれも接種後 21 日の観察結果を示した。

### 3.7 植物体における 2 種のタンパク質の同時発現

ウイルスベクターによって、2 種の異なる外来タンパク質を同じ植物で発現させることは、ウイルスベクターの実用性を検討する上で重要である。PIAMV ベクターを用いて 2 種類のタンパク質を同一の細胞で発現させることが可能かどうかを調べるため、pLi1-evec のマルチクロニングサイトに、赤色の蛍光を発する mCherry の遺伝子を挿入した

pLil-evec:mCherry を構築した。pLil-evec:nGFP および pLil-evec:mCherry をそれぞれ形質転換したアグロバクテリウムを、1:1 の割合で混合し、*N. benthamiana* の展開葉にアグロインフィルトレーションした。その結果、接種後 12 日で上葉に GFP と mCherry の蛍光がともに観察された (図 4.14, a と b)。また、詳細に蛍光を観察すると、2 種類の蛍光は互いに空間的に重なっていなかった (図 4.14, c-f)。多くの感染葉を観察したが、両方のタンパク質を発現して黄色の蛍光を発した細胞は非常に少なかった。以上から、PIAMV ベクターは、植物体全身で効率よく外来タンパク質を発現し得るが、2 種類のタンパク質を同一細胞内で同時に発現させることはできないと考えられた。

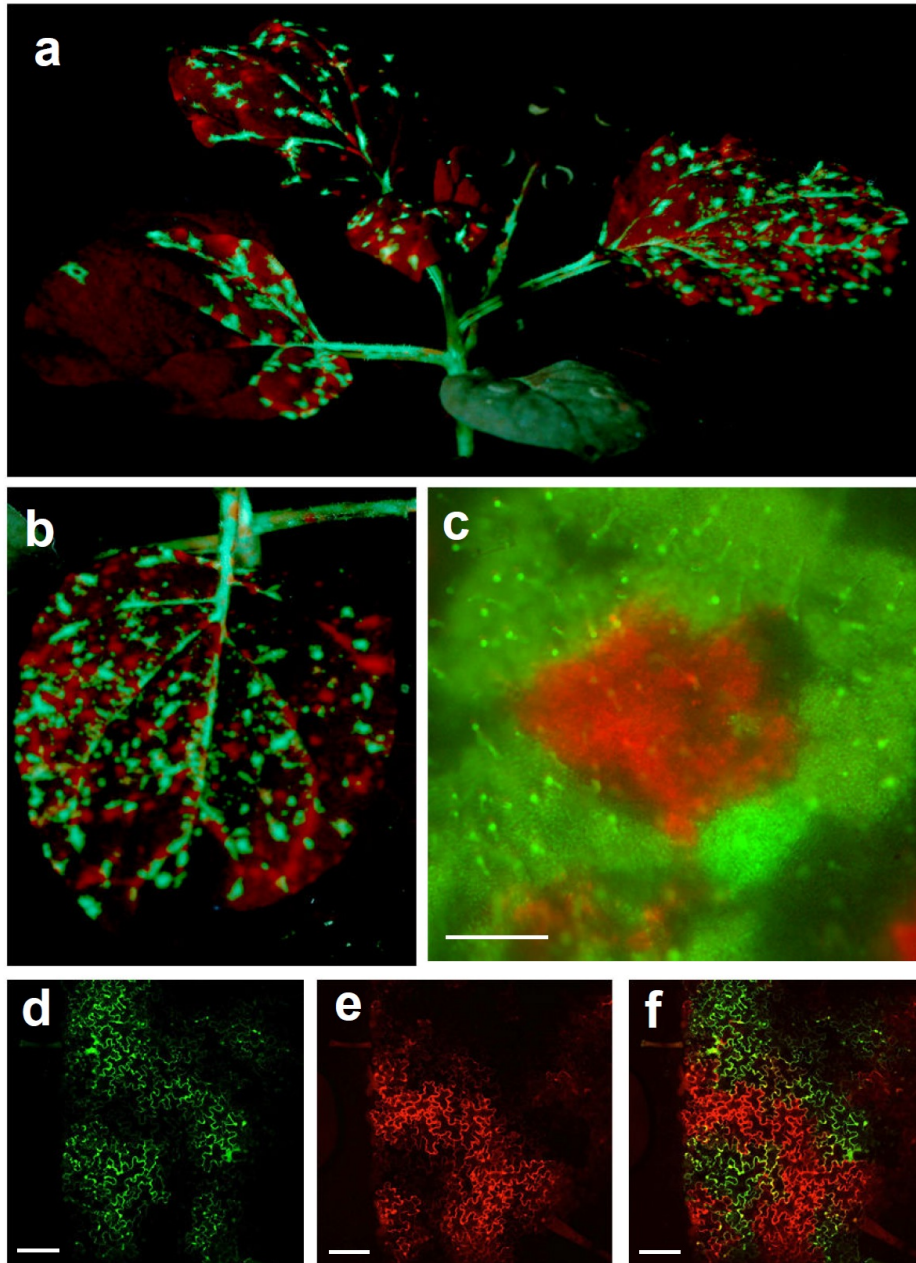


図 4.14 GFP 発現 PIAMV ベクター (pLi1-evec:nGFP) および mCherry 発現 PIAMV ベクター (pLi1-evec:mCherry) を共接種した *N. bentamiana* における蛍光観察

(a) pLi1-evec:nGFP および pLi1-evec:mCherry を共接種した野生型 *N. bentamiana* の接種後 12 日における全体像。(b) a に示した植物の上位葉の写真。(c) pLi1-evec:nGFP および pLi1-evec:mCherry を共接種した *N. bentamiana* の表皮細胞の実体顕微鏡による観察。バーは 1mm。(d-f) pLi1-evec:nGFP および pLi1-evec:mCherry を共接種した *N. bentamiana* 表皮細胞の、共焦点レーザー顕微鏡による観察。それぞれ GFP 蛍光、mCherry 蛍光、重ね合わせの画像を示す。写真は接種後 21 日で撮影した。バーは 100  $\mu\text{m}$ 。

## 4. 考察

### 4.1 PIAMV ベクター構築の過程で得られた示唆

PIAMV は *Potexvirus* 属ウイルスの中でもユニークなゲノム構造を有している。すなわち、PIAMV は他の多くの *Potexvirus* 属ウイルスと異なり、TGBp3 と CP の一部が重なるようにコードされている。この特徴から、本来の CP サブゲノムプロモーターの直下に外来遺伝子を直接挿入すると、TGBp3 の C 末端が欠損してしまい感染性が著しく低下すると考えられる。すなわち、外来遺伝子を挿入する箇所の直上流では、PIAMV の CP の開始コドンから TGBp3 の終止コドンまでの配列 (5362 番目から 5390 番目の塩基) を保持しなければならない。従って、PIAMV の場合、サブゲノム RNA プロモーターを重複させる方法をとると、CP の開始コドンから TGBp3 の終止コドンまでの配列に相当する分 (5362 番目から 5390 番目の塩基) だけ、外来遺伝子を発現させるために重複させるべき配列が他の *Potexvirus* 属ウイルスよりも長くなる。実際に、一般に広く使用されている PVX ベクターでは、外来遺伝子は本来の CP サブゲノム RNA のプロモーター配列の直下に挿入されており、その重複配列は 32 塩基であるのに対して (Baulcombe et al., 1995)、Li1-sGFP では重複配列は 86 塩基にわたり、これが Li1-sGFP で観察された sGFP 遺伝子の脱落の原因であると考えられる。

そこで、高発現・安定な PIAMV ベクターを構築するため、異なるアプローチを取ることとした。すなわち、外来遺伝子配列を FMDV の 2A 配列を介して CP 遺伝子配列と接続し、融合タンパク質として発現させるというアプローチである。この sGFP-2A-CP 融合ベクターを構築する前に、まず Li1-sGFP の sGFP 遺伝子直下にある CP サブゲノム RNA のプロモーター配列および CP を欠損させた上で、sGFP 遺伝子の開始コドンに改変を加え、その発現効率を解析した。*N. benthamiana* に接種した Li1-sGFP $\Delta$ CP のウエスタンブロット解析およびノーザンブロット解析の結果、sGFP 遺伝子の発現は確認できなかった (図 4.9)。一方、PIAMV の CP の開始コドンおよび CP の N 末端のオーバーラップ領域を残した Li1-CPNsGFP $\Delta$ CP は、一定量の sGFP を発現させることができた (図 4.9)。この結果は、Li1-sGFP $\Delta$ CP の sGFP の開始コドン近傍の配列が sGFP の発現に適していないことを示唆している。真核生物において、mRNA からの翻訳量は、5'末端の非翻訳領域の長さや GU 比率に加え、開始コドン近傍の配列の文脈により制御されていることが知られている (Kawaguchi and Bailey-Serres, 2005; Lütcke et al., 1987)。これらのうちの 1 つ、もしくは複数が原因となり、pLi1-sGFP $\Delta$ CP の sGFP の翻訳量が抑えられている可能性がある。真核生物において、翻訳開始に最適な開始コドン近傍の配列は A/GxxAUGG (x は任意の塩基、下線部は開始コドン) であることが知られている (Kozak, 1986)。実際、Li1-sGFP $\Delta$ CP において人工的に作られた sGFP の開始コドンの近傍配列は、PIAMV の本来の CP の開始コドン近傍の配列 (ACCAUGG) と比べると、より翻訳に適していない配列 (UUCAUGG) であった。PIAMV の本来の CP の開始コドンは、進化の過程で CP が高発現するために最適化されていると考えられる。実際、本来の

CPの開始コドンを残した pLi1-CPNsGFP $\Delta$ CP は、sGFP を高効率に発現させることが可能であった (図 4.9, a と b)。さらには、Li1-CPNsGFP $\Delta$ CP から発現する sGFP のサブゲノム RNA の蓄積量は pLi1-sGFP $\Delta$ CP よりも有意に増加していた (図 4.9 c)。これらの結果は、サブゲノム RNA の蓄積量の増加と翻訳開始効率の上昇が、Li1-CPNsGFP $\Delta$ CP からの sGFP の高発現に寄与していることを示している。Li1-CPNsGFP $\Delta$ CP における sGFP のサブゲノム RNA 蓄積量の増加は、おそらく開始コドンの変更によりサブゲノム RNA の安定性が上昇したことによると考えられるが、詳細な原因は不明である。

続いて、PIAMV ベクターが植物に全身感染できるようにするため、FMDV の 2A 配列を介して sGFP 遺伝子に CP を融合した pLi1-CPNsGFP-fCP を構築した。しかしながら、この変異ウイルスにおいても sGFP 遺伝子は、植物体におけるウイルスの増殖の過程で、おそらく TGBp3 と CP がオーバーラップした領域にあたる、30 塩基の重複で生じた相同組換えの影響により、すぐに抜け落ちてしまった。最終的には、重複配列による相同組換えを防ぐために、CP の N 末端領域に同義置換を導入した pLi1-CPNsGFP-mtfCP を構築することにより、sGFP 発現を安定的に発現する PIAMV ベクターを植物に全身感染させることが可能となった (図 4.11)。

## 4.2 PIAMV ベクターの特徴

本研究で作出した PIAMV ベクター pLi1-vec の特長の一つは、図 4.11 のように、目的タンパク質を安定的に継続して植物体内で発現させることができることである。一方、PVX-GFP から発現する nGFP 遺伝子は、たとえ相同組換えを引き起こすことのない、2A 配列を介した発現であっても、*N. benthamiana* における数回の継代接種で抜け落ちてしまう、という実験結果を得ている。2A 配列を介した発現方法をとる *Potexvirus* 属ウイルスベクターの挿入遺伝子の不安定性は、pepino mosaic virus (PepMV) ベクターでも知られており、3 代の継代でインサートが抜け落ちると報告されている (Sempere et al., 2011)。これらに比べ、本研究で構築した PIAMV ベクターは非常に安定である。この安定性の理由は、PIAMV が強いサイレンシング抑制能を有するためであると考えられる (Senshu et al., 2009)。反対に、PVX-GFP からの nGFP 遺伝子の早急な脱落は、ウイルスの感染によって誘導された強い RNA サイレンシングの圧力が、外来挿入遺伝子の脱落を促進するというモデル (Barajas et al., 2006) で説明できるかもしれない。しかしながら、他の *Potexvirus* 属ウイルスのゲノム (PVX はおよそ 6.5 kb、PepMV はおよそ 6.4 kb) に比べて、短い PIAMV のゲノム (およそ 6.1 kb) が外来遺伝子の保持を可能にしている可能性を排除することもできない。

また、PIAMV ベクターが示した強い RNA サイレンシング抑制能から、異なる蛍光タンパク質を発現する PIAMV ベクター間で生じた空間的分離 (図 4.14) の原因に関する考察をすることができる。異なる蛍光タンパク質をラベルした同種の *Potyvirus* 属ウイルスの間で、同様の空間的分離が報告されており (Dietrich and Maiss, 2003)、この現象に RNA サイレン



シングの関与が示唆されているが、その真偽は不明である。PIAMV ベクターは、RNA サイレンシングを強く抑制していると考えられるが、空間的分離が見られたため、この現象は RNA サイレンシングによるものではない可能性が高い。また、全く別種のウイルスである cucumber mosaic virus と turnip mosaic virus の混合感染で見られる空間的分離には、RNA サイレンシングは関与していない (Takeshita et al., 2012)。従って、この空間的分離には、限られた細胞内のリソースをめぐる、異なる 2 種類のウイルスバリエーション間の競合が関与している可能性がある。今回構築した PIAMV ベクターは、空間的分離を引き起こすため、生物学的に活性がある 2 種類のタンパク質を 1 細胞で同時に発現させるには、他の戦略が必要である。例えば、空間的分離を起こさない 2 種のウイルスベクターの利用や (Giritch et al., 2006; Lim et al., 2010b)、1 種のウイルスベクターから複数の外来遺伝子を発現させることが有効であると考えられる (Masuta et al., 2000)。

本研究で構築した PIAMV ベクター-pLil-evec の短所を挙げるとすれば、目的タンパク質の N 末端に PIAMV の CP の N 末端の部分領域が融合されてしまうことである。さらに、RNA サイレンシング抑制能が強いこともあり、ウイルス誘発性遺伝子サイレンシング (viral-induced gene silencing; VIGS) ベクターとしての利用は現在のところ困難である。この点は、近年報告された、VIGS に適した PepMV ベクターとは対照的である (Sempere et al., 2011)。この短所については、今後さらに改良を重ねる予定である。実際、近年の報告によると、TGBp1 の特定の 2 アミノ酸への変異導入により、タンパク質発現に適した *Potexvirus* 属のウイルスベクターを、VIGS に適したベクターへと改良できることが示されており (Lim et al., 2010a)、この方法は PIAMV ベクターにも適応できる可能性が高い。このような欠点はあるが、本研究で構築された PIAMV ベクターは、モデル植物であるシロイヌナズナに感染し、タンパク質を安定的かつ高効率に発現させることができる。従って、この PIAMV ベクターは、ウイルス抵抗性のエコタイプや変異体のスクリーニングを含めた、宿主植物-ウイルス相互作用の研究に利用できる強力なツールとして利用可能である。



## 第5章 総合考察

植物ウイルスが作物に感染した場合、葉や花器、果実、茎、根、塊茎などの器官に様々な症状（病徴）を生じ、品質の低下や収量の減少等、農業生産上甚大な被害をもたらす。植物ウイルスは宿主の細胞内に寄生して増殖することから、農薬などによる化学的防除は不可能である。そのため、植物ウイルスの防除には主に抵抗性品種の開発や媒介昆虫の駆除、弱毒ウイルスの利用などに頼らざるを得ない状況である。しかしゲノム核酸に変異を獲得しやすいという植物ウイルス特有の性質を考慮すると、いずれの手法もその効果は限られており、新規な防除法が求められている。従って、植物ウイルスの増殖制御機構や病原性発現機構を分子レベルで解明することは、ウイルス—植物の複雑な相互作用を理解するだけでなく、効果的なウイルス防除法の開発に繋がると考えられる。

本研究では、プラス一本鎖 RNA ウイルスを用いて、植物ウイルスの増殖制御機構とその病原性に関する研究を行った。ウイルスは、植物細胞内で寄生的に増殖するが、ウイルスが植物に示す病原性は、感染過程の様々な段階におけるウイルスと植物のせめぎ合いの所産である (Maule et al., 2002)。ウイルスと植物のせめぎ合いの例には、ウイルスがその増殖過程において多数の宿主因子や宿主の代謝産物を巧妙に利用することや、植物が備える様々なウイルス増殖制御機構とそれに対するウイルスの対抗戦略などがある。このようなことから、植物ウイルスの病原性発現機構の一端を理解するためには、ウイルスによる宿主因子群の利用や、植物が備えるウイルス増殖制御機構を解明することが不可欠であると考え、本研究を遂行した。

第2章において、病徴を呈する2株ならびに無病徴の2株のポインセチアから分離した PnMV 分離株の全ゲノム配列を比較し、ウイルスの病原性に RdRp が関わる可能性を明らかにし、ウイルスの増殖が病原性を決定する要因であるという示唆を得た。

第3章において、PIAMV のサプレッサー TGBp1 はウイルスに対する RNA サイレンシングを抑制することで、ウイルスの増殖量を増加させることを示した。同時に TGBp1 は、植物内在性の RNA サイレンシング経路 (tasiRNA 経路) で生成される tasiRNA の蓄積量を、サプレッサー活性の副作用として減少させ、植物に形態異常を引き起こした。このことから、TGBp1 による、ウイルス増殖の促進と、サプレッサー活性の副作用の両方が PIAMV の病原性に関与していると考えられる。

第4章において、PIAMV のサプレッサー TGBp1 の RNA サイレンシング抑制活性を利用して、植物におけるタンパク質発現系に用いることができるウイルスベクターを構築し、そのタンパク質発現効率が高いことを確認した。それは PIAMV の TGBp1 の RNA サイレンシング抑制活性が高いことに起因しており、これによりウイルス増殖が促進されていることが示唆された。

現在、ウイルスの病原性発現機構に関しては、2つのモデルが提唱されている。1つは、ウイルスは宿主植物の代謝系を利用して増殖するため、ウイルスの感染によって植物の代謝資源が収奪され、その結果として植物の成長や発達が阻害されて病徴が現れるという、“Competitive disease model”である (Culver and Padmanabhan, 2007; Fraser, 1987; Hull, 2002)。TMVの感染葉では、ウイルス由来のタンパク質やゲノムRNAの質量が葉の生重量の1%にも達し (Matthews, 1991)、感染葉で翻訳されるタンパク質の半分以上をTMVタンパク質が占めると言われている (Siegel et al., 1978)。また、ウイルスが感染した植物の組織では、おそらくウイルスが自身で利用できる資源を増加させるために、宿主植物の内在性mRNAの転写や翻訳量が低下する現象が報告されている (Maule et al, 2000; Wang and Maule, 1995)。さらには、ウイルスゲノムRNAには、internal ribosome entry site等のウイルスタンパク質の翻訳を促進する領域が存在しており、これが宿主植物との資源をめぐる競合において、ウイルスに有利に機能していると考えられる (Thivierge et al., 2005)。このように、病原性発現をウイルスと植物間の代謝資源をめぐる攻防で説明する Competitive disease modelは非常にシンプルなものである。しかしながら、様々なウイルス—宿主植物間で、病徴の激しさとウイルスの増殖量が相関していない例が多数報告されている (Balachandron et al., 1994; Diener, 1963; Gal-On, 2000; Saentz et al., 2001)。さらに、tomato spotted wilt virus (TSWV)においては、病徴を引き起こすTSWV系統の感染葉と、無病徴感染するTSWV系統の感染葉では、ウイルス増殖量および光合成量がほぼ同じであること (Rowland et al., 2005) から、病徴の程度と代謝資源の量は直接的な関係性が無いことが示唆されている。従って、少なくとも一部のウイルス—宿主植物間では、資源をめぐるウイルスと宿主植物の競合は、病原性を誘導する主要な要因ではない可能性がある。

ウイルスの病原性発現機構を説明する2つ目のモデルは、ウイルス因子が宿主植物側のある特定のタンパク質の機能を阻害し、そのタンパク質に関わる代謝系に異常を生じた結果、病原性を発揮するという “Interaction disease model” である (Culver and Padmanabhan, 2007; Fraser, 1987; Hull, 2002)。このモデルは、近縁な2種のウイルスが同じ植物に異なる病徴を誘導する現象や、同じウイルスが異なる植物において異なる病原性を発揮する現象を合理的に説明することができる。近年このモデルに合致するウイルス因子—宿主因子相互作用がいくつか報告されている (Culver and Padmanabhan, 2007; Pallas and García, 2011)。例えば、TMVのRdRpは、植物のオーキシン応答遺伝子の発現を制御するAux/IAAタンパク質と結合し、その細胞内局在を変化させる。その結果、オーキシン応答遺伝子の発現を攪乱し、正常な形態形成を阻害する (Padmanabhan et al., 2005; Padmanabhan et al., 2006)。これまでに、植物に形態異常を引き起こすウイルスが多数報告されている。形態異常誘導メカニズムの一つとして、上記したTMVのRdRpとAux/IAAタンパク質の相互作用と同様に、ウイルス因子による植物ホルモン経路の阻害が挙げられる。Geminivirus科のBegomovirus属およびCurtovirus属に分類されるウイルスがコードするC4タンパク質は、植物ホルモンのブラシノステロイド応答経路を阻害することで、形態異常を誘導する (Latham et al., 1997;

Piroux et al., 2007; Mills-Lujan and Deom, 2010)。また、植物ホルモンの応答経路阻害とは異なるメカニズムで植物に奇形を誘導するタンパク質として、tomato yellow leaf curl China virus のサテライト DNA がコードする  $\beta$ C1 タンパク質や potato virus M がコードする p12 タンパク質がある。 $\beta$ C1 は、植物の葉の背腹極性を制御するタンパク質である ASYMMETRIC LEAVES 1 と結合し機能を阻害することで、葉の正常な形態形成を阻害し、葉巻などの病徴を引き起こす (Yang et al., 2008)。p12 は植物の細胞のサイズと細胞分裂を制御する *upp-L* 遺伝子のプロモーター領域に結合し、転写因子として機能することで *upp-L* 遺伝子発現を促進し、植物組織を増生させる (Lukhovitskaya et al., 2013)。さらには、ウイルスがコードするサプレッサーが、植物に形態異常を誘導する例も報告されている。これは、ウイルス防御機構としての RNA サイレncing 経路と植物の形態形成に関与する miRNA 経路などの RNA サイレncing 経路において、両者に共通して機能する AGO1 などの因子が存在しており、多くのサプレッサーが AGO1 のような因子をターゲットとしているからであると考えられる (Culver and Padmanabhan, 2007)。本研究においても、PIAMV の TGBp1 は単独発現でシロイヌナズナに形態異常を引き起こす (第 3 章)。これは TGBp1 が、ウイルス防御機構としての RNA サイレncing 経路のなかの増幅過程および、シロイヌナズナの葉の形態形成に関わる tasiRNA 経路の両方に関与する SGS3 および RDR6 と相互作用することにより、これらの因子の機能を阻害した結果であると考えられ、Interaction disease model と一致すると考えられる。

以上から、現在のところ、ウイルスの病原性を制御する主な要因は、ウイルス因子による宿主植物側の特定の因子の機能阻害であるという説が有力となっている。従って、PIAMV について、病原性を制御する主な要因は、ウイルス増殖量自体ではなく、TGBp1 のサプレッサー活性による tasiRNA 経路の阻害であると考えられる。

しかしながら、ウイルスの増殖は、ウイルス因子の発現と独立した現象ではなく、ウイルス因子の発現量を制御するものである。すなわち、ウイルス増殖量が増加すると、ウイルス因子の発現量も増加することになる。このように、ウイルスの増殖量というのは、各ウイルス因子の発現量を制御することによって、病原性発現の二次的な要因となっていると考えられる。このような、ウイルス増殖量の増加に起因するウイルスの病原性因子の増加によって、病徴が強く誘導されるという知見は、ウイルスによる壊死や HR について報告されている。例えば、PIAMV の 2 つの分離株 (Li1, Li6) は、*N. benthamiana* に全身感染し、異なる病徴 (Li1: 全身壊死、Li6: 無病徴) を引き起こす。Li1 の全身壊死を引き起こすウイルス側の因子は RdRp 内部のヘリカーゼドメインであるが、Li6 のヘリカーゼドメインも大量に発現させれば壊死を誘導する。また、ウイルス増殖量および RdRp の蓄積量は Li6 よりも Li1 の方が多い。これらのことから、PIAMV では、ウイルスの増殖量が高まり、結果として複製酵素が多量に蓄積することで壊死病徴が発現すると考えられる (Komatsu et al., 2011)。また、タバコの抵抗性遺伝子 (*R* 遺伝子) である *N* 遺伝子が、TMV の RdRp のヘリカーゼドメイン (p50) を認識して誘導する HR の強さは、p50 の発現量依存的である。反

対に、エリシターが p50 を含んだ RdRp 全長で発現された際には、おそらく RdRp 全長は p50 よりも分子量が大きく翻訳効率が低いため、HR の誘導が遅く弱くなる (Abbink et al. 1998; Erickson et al. 1999)。

以上の一連の知見より、ウイルスの病原性を制御しているのは主に各ウイルス因子が植物に与える阻害的影響であるが、ウイルス増殖量も、ウイルス因子の発現量を制御することにより、病原性発現の二次的な要因となっていると考えられる。

第 4 章においては、ウイルス病原性発現機構に関する解析で得られた知見を利用することで、効率的なタンパク質発現が可能な植物ウイルスベクターの作製を行った (第 4 章)。植物ウイルスベクターを用いた効率的なタンパク質発現システムを利用すれば、外来タンパク質を植物体で容易に高発現させることが可能であり、植物の分子生物学的研究で役立つツールの開発に応用できる可能性がある。また、GFP などの蛍光タンパク質でウイルスの感染過程を可視化することで、ウイルスの感染戦略や植物の抵抗性機構に関する研究が飛躍的に進展し、これらの成果がウイルス防除法の開発にも繋がることも期待される。今後さらに様々なウイルスにおいて、ウイルスの増殖制御機構とその病原性発現のメカニズムの解析がなされることが期待される。

## 摘要

植物ウイルスは、植物にモザイク、壊死等の様々な病徴を伴う病気を引き起こし、農業生産に被害を及ぼしている。ウイルスが植物に病気を引き起こす能力、すなわち病原性は、感染に伴う植物の代謝系の変化や、防御応答反応等、ウイルスと植物のせめぎあいの結果として現れるものと考えられるが、そのメカニズムはほとんど分かっていない。これを解明することは、ウイルス—植物の複雑な相互作用を理解するだけでなく、ウイルスの防除にも繋がるものである。

本研究では、ウイルスの病原性にウイルス複製酵素 (RdRp) が関わることを明らかにし、ウイルスの増殖が病原性を決定する要因であることを示した。また、植物によるウイルスの増殖抑制機構 (RNA サイレンシング) に対抗するウイルス因子 (サプレッサー) が RNA サイレンシングを抑制することにより、ウイルスの増殖を促進し、病原性を強化していることを明らかにした。さらに、サプレッサーの RNA サイレンシング抑制活性を利用して、植物における高効率なタンパク質発現系を構築した。

### 1. ウイルスの病原性に関わる複製酵素に関する解析

植物ウイルスの病原性に関わるウイルス因子については近年様々な知見が得られているが、複製酵素が重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。そこで、ポインセチアモザイクウイルス (PnMV) をモデルに、その複製酵素の病原性に関わる因子を解析した。PnMV は、*Tymovirus* 科の未帰属種に分類されるプラス一本鎖 RNA をゲノムに持つウイルスで、ポインセチアの葉に奇形やモザイクを生じる。

本研究ではポインセチアに病徴を呈する 2 株、無病徴の 2 株、計 4 株の PnMV 分離株 (JO1, JO2, JO4, JO5) を用いて実験を行った。これら JO 分離株の全塩基配列を決定した結果、いずれも、3'末端にポリ A 配列を持ち、このポリ A 配列を除くゲノム配列の全長は 6106 塩基であった。ゲノム上には、一つの長い ORF が存在し、約 220 kDa の単一のタンパク質をコードしていた。このタンパク質には、4つの保存ドメイン [メチルトランスフェラーゼドメイン、パパイン様プロテアーゼドメイン (PRO)、ヘリカーゼドメイン (HEL)、レプリカーゼドメイン (REP)] から成る RdRp および外被タンパク質 (CP) の保存配列が存在し、同一フレーム上に RdRp と CP が融合タンパク質としてコードされていた。

病原性に関わる因子を解析するため、これら JO 株のゲノムにコードされる単一タンパク質のアミノ酸配列について比較解析を行ったところ、RdRp の HEL-REP ドメイン間の 1218 番目のアミノ酸に、病徴型と相関性のある多型が見出された。このドメイン間領域は *Tymovirus* 科 *Tymovirus* 属ウイルスにおいて自己切断が生じる共通領域であり、9 アミノ酸の配列を PRO が認識することで切断が生じる。4 分離株の全てにおいて切断に重要なアミノ酸が保存されていたことから、PnMV でもこの部位で自己切断するものと考えられた。病徴

型と相関のある 1218 番目のアミノ酸は、この推定切断部位より 2 アミノ酸下流に位置していた。このことは、1218 番目のアミノ酸が HEL-REP 間における切断効率、もしくは、切断によって生じる REP タンパク質の性質に影響を与え、ウイルス複製効率に影響を与え、病原性に関わっているものと考えられた。

## 2. 植物によるウイルスの増殖抑制機構を抑止するサプレッサーの解析

植物では、遺伝子発現調節機構である RNA サイレンシングがウイルス抵抗性にも関わる。ウイルスが植物細胞内に侵入すると、ウイルス RNA から小分子 RNA が生成され、相補的なウイルス RNA を切断することにより、ウイルスの増殖抑制機構として働く。ウイルスはその対抗手段として、自身のゲノムに RNA サイレンシング抑止タンパク質(サプレッサー)をコードしている。サプレッサーに変異を入れると、ウイルス蓄積量の減少や感染性の喪失が起きるため、サプレッサーによる RNA サイレンシングの抑止は、植物によるウイルス増殖抑制機構を抑止する重要な機能であると考えられる。また、サプレッサーは植物内在性の RNA サイレンシング経路を攪乱し、形態異常などの生育不良を誘導する。従って、サプレッサーはウイルスの病原性を制御する因子でもと考えられ、植物ウイルスの病原性発現機構の解明においてサプレッサーの機能解析は重要である。

*Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) は、*Alphaflexivirus* 科 *Potexvirus* 属に属し、ゲノムは約 6.1 kb のプラス一本鎖 RNA である。ゲノム上には 5 つの ORF が存在し、5'側から順に、RdRp、triple gene block protein と呼ばれる 3 つの移行タンパク質 (TGBp1, -2, -3)、CP をコードする。このうち TGBp1 がサプレッサー活性を持つ。RdRp はゲノム RNA から翻訳されるが、他のタンパク質は、各 ORF の上流のプロモーターによって転写調節されるサブゲノム RNA を介して翻訳される。*Potexvirus* 属の TGBp1 はサプレッサーとして様々な解析に用いられているにも関わらず、詳細な機能メカニズムは不明である。本研究では、PIAMV の TGBp1 を用いて病原性の制御に関わる機能解析を行った。

まず、TGBp1 形質転換シロイヌナズナにおいて、植物の内在性の RNA サイレンシング経路の 1 つである *trans-acting* siRNA (*tasiRNA*) 経路に関わる因子の欠損変異体に類似した形態異常が観察されたため、*tasiRNA* 合成経路の解析を行った。*tasiRNA* は以下のような経路を経て合成される。すなわち、ノンコーディングな TAS 遺伝子領域から転写された前駆体 RNA が miRNA/AGO 複合体によって切断され、切断断片を鋳型に二本鎖 RNA が合成される。次いで、二本鎖 RNA から *tasiRNA* が切り出され、*tasiRNA* と相補的な配列を有するターゲット mRNA が切断される。大規模シーケンス解析により TGBp1 形質転換体では *tasiRNA* 蓄積量が大幅に減少していることを示した。一方で、ノーザンブロット解析により TAS 前駆体 RNA の切断は正常に起こっていることを明らかにした。また、RNase protection assay により二本鎖 RNA は検出されないことを示した。以上より、TGBp1 は *tasiRNA* 経路中の二本鎖 RNA 合成の段階を阻害することが示された。

さらに、ウイルス感染における TGBp1 の機能を解析するため、ウイルス接種試験を行ったところ、TGBp1 形質転換体では野生型植物に比べてウイルス蓄積量が大きく増加した。このことから、TGBp1 はウイルスに対する RNA サイレncing を抑止することにより、ウイルスの増殖を促進することが示唆された。

以上より、PIAMV の TGBp1 は、そのサプレッサー能により、植物内在性の tasiRNA 経路を攪乱し形態異常を誘導するとともに、ウイルスに対する RNA サイレncing を抑止することによりウイルス増殖を促進し、PIAMV の病原性に関与していることが示唆された。

### 3. 植物のウイルス増殖抑制機構のサプレッサーを利用したタンパク質高発現系の構築

植物ウイルスベクターは、植物の遺伝子を過剰発現し、機能を解析するツールとして有用である。potato virus X (PVX) ベクターが植物ウイルスベクターとして有名であるが、導入遺伝子の発現量や安定性に課題がある。本研究では、PVX と比べて強いサプレッサーを持つ PIAMV を用いて、効率的なタンパク質発現ウイルスベクターの構築を試みた。

まず、PIAMV の CP のサブゲノム RNA のプロモーター領域を重複させ、下流に GFP 遺伝子を挿入する方法を試みた。しかし、接種の結果、GFP 蛍光は見られず、ベクターから GFP 遺伝子の脱落が確認された。GFP が発現しなかった原因として、GFP 遺伝子の開始コドン近傍の塩基配列がタンパク質発現に適さない配列であること、および重複させた配列が相同組換えを引き起こし、GFP 遺伝子の脱落を誘導していることが考えられた。そこで、CP 遺伝子の開始コドンを利用して GFP 遺伝子を発現する改変を施し、さらに配列重複を避けるため、口蹄疫ウイルスが持つ自己切断配列である 2A 配列を挟んで、GFP と CP を融合タンパク質として翻訳させ、CP の N 末端領域には同義置換変異を導入した。その結果、植物体において安定的に目的タンパク質を発現させることができた。続いて、既報の PVX ベクターと GFP 発現パターンを比較したところ、PIAMV ベクターの方が長期間 GFP を発現した。さらに、GFP 形質転換植物への接種の結果、PIAMV ベクターの方が RNA サイレncing の誘導能が低いことが示された。従って、PIAMV ベクターによる目的タンパク質の安定的な発現は、PIAMV の TGBp1 の持つ強いサプレッサー活性に起因しており、これによりウイルス増殖が促進されていることが示唆された。

以上から、ウイルスの病原性は、各ウイルスタンパク質が植物内在性の代謝経路に阻害的な影響を与え、それが積み重なることによって決定されると考えられる。さらに、ウイルス増殖量も、ウイルスタンパク質の発現量を制御することにより、病原性発現の二次的な要因となっていると考えられる。

## 謝辞

本研究の遂行するに当たり、東京大学大学院 農学生命科学研究科 教授 難波成任博士には終始懇切なご指導を賜り、さらに研究指導を超えた様々な教えをいただきましたことを心より感謝申し上げます。

また、同研究科准教授 山次康幸博士、同研究科助教 橋本将典博士には、実験における技術的指導のみならず、本稿の御校閲を賜り、深く感謝申し上げます。

植物病理学研究室、植物医科学研究室のスタッフ、学友や研究技術補佐員の皆様、学生センタースタッフの方々には様々な面で助けられ、有益なアドバイスをいただきました。

最後に、これまでの研究生活を一心に支えてくれた家族には大変な苦勞を掛けながら、常に激励をいただきました。学友も含めお世話になった方すべてに、深甚なる感謝の意を表します。



## 引用文献

Abbink, T. E. M., Tjernberg, P. A., Bol, J. F., Linthorst, H. J. M. (1998) Tobacco mosaic virus helicase domain induces necrosis in *N*-gene carrying tobacco in the absence of virus replication. *Mol Plant Microbe Interact* **11**, 1242-1246.

Adenot, X., Elmayan, T., Laressergues, D., Boutet, S., Bouche, N., Gascioli, V., Vaucheret, H. (2006) DRB4-dependent TAS3 trans-acting siRNAs control leaf morphology through AGO7. *Cur Biol* **16**, 927-932.

Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A. M., Carrington, J. C. (2005) microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* **121**, 207-221.

An, G. (1995) Binary Ti plasmid vectors. *Methods Mol Biol* **44**, 47-58.

Avesani, L., Marconi, G., Morandini, F., Albertini, E., Bruschetta, M., Bortesi, L., Pezzotti, M., Porceddu, A. (2007) Stability of Potato virus X expression vectors is related to insert size: implications for replication models and risk assessment. *Transgenic Res* **16**, 587-597.

Azevedo, J., Garcia, D., Pontier, D., Ohnesorge, S., Yu, A., Garcia, S., Braun, L., Bergdoll, M., Hakimi, M. A., Lagrange, T., Voinnet, O. (2010) Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev* **24**, 904-915.

Barajas, D., Tenllado, F., Díaz-Ruíz, J. R. (2006) Characterization of the recombinant forms arising from a Potato virus X chimeric virus infection under RNA silencing pressure. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 904-913.

Bartel, D. P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-297.

Balmori-Melian, E., MacDiarmid, R. M., Beck, D. L., Gardner, R. C., Forster, R. L. S. (2002) Sequence-, tissue-, and delivery-specific targeting of RNA during post-transcriptional gene silencing. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 753-763.

Baulcombe, D. C., Chapman, S., Cruz, S. S. (1995) Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J* **7**, 1045-1053.

Baumberger, N., Tsai, C. H., Lie, M., Havecker, E., Baulcombe, D. C. (2007) The Polerovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr Biol* **17**, 1609-1614.

Bayne, E. H., Rakitina, D. V., Morozov, S. Y., Baulcombe, D. C. (2005) Cell-to-cell movement of potato potexvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. *Plant J* **44**, 471-482.

Bendahmane, A., Kohm, B.A., Dedi, C., Baulcombe, D.C. (1995). The coat protein of potato virus X is a strain-specific elicitor of *Rx*-mediated virus resistance in potato. *Plant J* **8**, 933-941.

Blevins, T., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P. V., Beknazariants, D., Si-Ammour, A., Park, H. S., Vazquez, F., Robertson, D., Meins, F., Jr., Hohn, T., Pooggin, M. M. (2006) Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Res* **34**, 6233-6246.

Bortolamiol, D., Pazhouhandeh, M., Marrocco, K., Genschik, P., Ziegler-Graff, V. (2007) The Polerovirus F

box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Curr Biol* **17**, 1615-1621.

Bradel, B. G., Preil, W., Jeske, H. (2000) Sequence Analysis and Genome Organization of Poinsettia Mosaic Virus (PnMV) Reveal Closer Relationship to Marafiviruses Than to Tymoviruses. *Virology* **271**, 289-297.

Bransom, K. L., Weiland, J. J., Dreher, T. W. (1991) Proteolytic maturation of the 206-kDa nonstructural protein encoded by turnip yellow mosaic virus RNA. *Virology* **184**, 351-358.

Bransom, K. L., Wallace, S. E., Dreher, T. W. (1996) Identification of the cleavage site recognized by the turnip yellow mosaic virus protease. *Virology* **217**, 404-406.

Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W. X., Ji, L. H., Ding, S. W., Baulcombe, D. C. (1998) Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J* **17**, 6739-6746.

Burgyán, J., Havelda, Z. (2011) Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci* **16**, 265-272.

Chapman, E. J., Prokhnovsky, A. I., Gopinath, K., Dolja, V. V., Carrington, J. C. (2004) Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev* **18**, 1179-1186.

Chen, J., Li, W. X., Xie, D., Peng, J. R., Ding, S. W. (2004) Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but upregulates the role of microRNA in host gene expression. *Plant Cell* **16**, 1302-1313.

Chiko, A. W. (1983) Poinsettia mosaic virus in British Columbia. *Plant Dis* **67**, 427-428.

Chiu, M. H., Chen, I. H., Baulcombe, D. C., Tsai, C. H. (2010) The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Mol Plant Pathol* **11**, 641-649.

Chung, B. N., Canto, T., Palukaitis, P. (2007) Stability of recombinant plant viruses containing genes of unrelated plant viruses. *J Gen Virol* **88**, 1347-1355

Clough, S. J., Bent, A. F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735-743.

Crick, F. H. (1966) Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J Mol Biol* **19**, 548-555.

Cruz, S. S., Chapman, S., Roberts, A. G., Roberts, I. M., Prior, D. A., Oparka, K. J. (1996) Assembly and movement of a plant virus carrying a green fluorescent protein overcoat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6286-6290.

Csorba, T., Pantaleo, V., Burgyán, J. (2009) RNA silencing: an antiviral mechanism. *Adv Virus Res* **75**, 35-71.

Culver, J. N., Padmanabhan, M. S. (2007) Virus-induced disease: altering host physiology one interaction at a time. *Annu Rev Phytopathol* **45**, 221-243.

Curaba, J., Chen, X. (2008) Biochemical activities of Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase 6. *J Biol Chem* **283**, 3059-3066.

Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., Baulcombe, D. C. (2000) An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* **101**, 543-553.

Dalmay, T., Horsefield, R., Braunstein, T. H., Baulcombe, D. C. (2001) SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *EMBO J* **20**, 2069-2078.

Decroocq, V., Salvador, B., Sicard, O., Glasa, M., Cosson, P., Svanella-Dumas, L., Revers, F., García, J. A., Candresse, T. (2009) The determinant of potyvirus ability to overcome the RTM resistance of Arabidopsis thaliana maps to the N-terminal region of the coat protein. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 1302-1311.

Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K. D., Carrington, J. C., Voinnet, O. (2006) Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* **313**, 68-71.

Diaz-Pendon, J. A., Li, F., Li, W. X., Ding, S. W. (2007) Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in Arabidopsis is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *Plant Cell* **19**, 2053-2063.

Diener T. O. (1963) Physiology of virus infected plants. *Annu Rev Phytopathol* **1**, 197-218.

Dietrich, C., Maiss, E. (2003) Fluorescent labeling reveals spatial separation of potyvirus populations in mixed infected *Nicotiana benthamiana* plants. *J Gen Virol* **84**, 2871-2876.

Ding, S., Keese, P., Gibba, A. (1990) The nucleotide sequence of the genomic RNA of Kennedy yellow mosaic tymovirus-Jervis Bay isolate: relationships with potex- and carlaviruses. *J Gen Virol* **71**, 925-931.

Ding, S. W., Voinnet, O. (2007) Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* **130**, 413-426.

Donaire, L., Barajas, D., Martinez-Garcia, B., Martinez-Priego, L., Pagan, I., Llave, C. (2008) Structural and genetic requirements for the biogenesis of tobacco rattle virus-derived small interfering RNAs. *J Virol* **82**, 5167-5177.

Dreher, T. W., Haenni, A. L., Mayo, M. A. (2000). Genus Tymovirus. In: Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E., Estes, M. K., Lemon, S., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D., Pringle, C. R., Wickner, R. B. (Eds) *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Academic Press, San Diego, pp 964-969.

Du, Z., Xiao, D., Wu, J., Jia, D., Yuan, Z., Liu, Y., Hu, L., Han, Z., Wei, T., Lin, Q., Wu, Z., Xie, L. (2011) p2 of rice stripe virus (RSV) interacts with OsSGS3 and is a silencing suppressor. *Mol Plant Pathol* **12**, 808-814.

Dunoyer, P., Lecellier, C. H., Parizotto, E. A., Himber, C., Voinnet, O. (2004) Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* **16**, 1235-1250.

Earley, K. W., Haag, J. R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., Pikaard, C. S. (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J* **45**, 616-629.

Edwards, M. C., Zhang, Z., Weiland, J. J. (1997) Oat blue dwarf marafivirus resembles the tymoviruses in

sequence, genome organization, and expression strategy. *Virology* **232**, 217-29.

Erickson, F. L., Holzberg, S., Calderon-Urrea, A., Handley, V., Axtell, M., Corr, C., Baker, B. (1999) The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the *N*-mediated defence response in tobacco. *Plant J* **18**, 67-75.

Fahlgren, N., Montgomery, T. A., Howell, M. D., Allen, E., Dvorak, S. K., Alexander, A. L., Carrington, J. C. (2006) Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA affects developmental timing and patterning in Arabidopsis. *Curr Biol* **16**, 939-944.

Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J. M., Desselberger, U., Ball, L. A. (eds.) (2005) *Virus taxonomy* (8<sup>th</sup> report). Academic Press.

Fraser R. (1987) *Biochemistry of Virus Infected Plants*: Letchworth, UK:Wiley. 259 pp.

Fukunaga, R., Doudna, J. A. (2009) dsRNA with 5' overhangs contributes to endogenous and antiviral RNA silencing pathways in plants. *EMBO J* **28**, 545-555.

Fulton, R. W., Fulton, J. L. (1980) Characterization of a tyro-like virus common in poinsettia. *Phytopathology* **70**, 321-324.

Gal-On, A. (2000) A Point Mutation in the FRNK Motif of the Potyvirus Helper Component-Protease Gene Alters Symptom Expression in Cucurbits and Elicits Protection Against the Severe Homologous Virus. *Phytopathology* **90**, 467-473.

Garcia, D., Collier, S. A., Byrne, M. E., Martienssen, R. A. (2006) Specification of leaf polarity in Arabidopsis via the trans-acting siRNA pathway. *Curr Biol* **16**, 933-938.

Garcia, D., Garcia, S., Pontier, D., Marchais, A., Renou, J. P., Lagrange, T., Voinnet, O. (2012) Ago hook and RNA helicase motifs underpin dual roles for SDE3 in antiviral defense and silencing of nonconserved intergenic regions. *Mol Cell* **48**, 109-120.

Garcia-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E. J., Sullivan, C. M., Fahlgren, N., Bremel, K. J., Carrington, J. C. (2010) Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection. *Plant Cell* **22**, 481-496.

Giner, A., Lakatos, L., Garcia-Chapa, M., Lopez-Moya, J. J., Burgyán, J. (2010) Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs. *PLoS Pathog* **6**, e1000996.

Giritch, A., Marillonnet, S., Engler, C., van Eldik, G., Botterman, J., Klimyuk, V., Gleba, Y. (2006) Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 14701-14706.

Gleba, Y., Klimyuk, V., Marillonnet, S. (2007) Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr Opin Biotechnol* **18**, 134-141.

Glick, E., Zrachya, A., Levy, Y., Mett, A., Gidoni, D., Belausov, E., Citovsky, V., Gafni, Y. (2008) Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 157-161.

- Guo, H., Song, X., Xie, C., Huo, Y., Zhang, F., Chen, X., Geng, Y., Fang, R. (2013) Rice yellow stunt rhabdovirus protein 6 suppresses systemic RNA silencing by blocking RDR6-mediated secondary siRNA synthesis. *Mol Plant Microbe Interact* **26**, 927-936.
- Hamilton, A. J., Baulcombe, D. C. (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**, 950-952
- Hashimoto, M., Komatsu, K., Maejima, K., Okano, Y., Shiraishi, T., Ishikawa, K., Takinami, Y., Yamaji, Y., Namba, S. (2012) Identification of three MAPKKs forming a linear signaling pathway leading to programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*. *BMC Plant Biol* **12**, 103.
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C., Voinnet, O. (2003) Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J* **22**, 4523-4533.
- Howell, M. D., Fahlgren, N., Chapman, E. J., Cumbie, J. S., Sullivan, C. M., Givan, S. A., Kasschau, K. D., Carrington, J. C. (2007) Genome-wide analysis of the RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE6/DICER-LIKE4 pathway in Arabidopsis reveals dependency on miRNA- and tasiRNA-directed targeting. *Plant Cell* **19**, 926-942.
- Hughes, P. L., Harper, F., Zimmerman, M. T., Scott, S. W. (2005) Nandina mosaic virus is an isolate of Plantago asiatica mosaic virus. *Eur J Plant Pathol* **113**, 309-313.
- Hull, R. (2002) In Matthews' Plant Virology: 4th ed. Academic Press, London.
- Ishibashi, K., Masuda, K., Naito, S., Meshi, T., Ishikawa, M. (2007) An inhibitor of viral RNA replication is encoded by a plant resistance gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13833-13838.
- Jakubiec, A., Drugeon, G., Camborde, L., Jupin, I. (2007) Proteolytic Processing of Turnip Yellow Mosaic Virus Replication Proteins and Functional Impact on Infectivity. *J Virol* **81**, 11402-11412.
- Jakubiec, A., Yang, S. W., Chua, N. H. (2011) Arabidopsis DRB4 protein in antiviral defense against Turnip yellow mosaic virus infection. *Plant J* **69**, 14-25
- Johansen, L. K., 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.
- Kagiwada, S., Yamaji, Y., Komatsu, K., Takahashi, S., Mori, T., Hirata, H., Suzuki, M., Ugaki, M., Namba, S. (2005) A single amino acid residue of RNA-dependent RNA polymerase in the *Potato virus X* genome determines the symptoms in *Nicotiana* plants. *Virus Research* **110**, 177-182.
- Kalantidis, K., Schumacher, H. T., Alexiadis, T., Helm, J. M. (2008) RNA silencing movement in plants. *Biol Cell* **100**, 13-26.
- Kalinina, N. O., Rakitina, D. V., Solovyev, A. G., Schiemann, J., Morozov, S. Y. (2002) RNA helicase activity of the plant virus movement proteins encoded by the first gene of the triple gene block. *Virology* **296**, 321-329.
- Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E. J., Krizan, K. A., Carrington, J. C. (2003) P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA uncton. *Dev Cell* **4**, 205-217.

- Kawaguchi, R., Bailey-Serres, J. (2005) mRNA sequence features that contribute to translational regulation in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* **33**, 955-965.
- Koenig, R., Lesemann, D. E. (1980) Two isometric viruses in poinsettias. *Plant Dis* **64**, 782-784.
- Koenig, R., Lesemann, D. E., Fulton, R. W. (1986) Poinsettia mosaic virus. *AAB Descr pl Viruses* 311.
- Koenig, R., Lesemann, D. E., Loss, S., Engelmann, J., Commandeur, U., Deml, G., Schiemann, J., Aust, H., Burgermeister, W. (2006) Zygocactus virus X-based expression vectors and formation of rod-shaped virus-like particles in plants by the expressed coat proteins of Beet necrotic yellow vein virus and Soil-borne cereal mosaic virus. *J Gen Virol* **87**, 439-443.
- Komatsu, K., Hashimoto, M., Maejima, K., Shiraishi, T., Neriya, Y., Miura, C., Minato, N., Okano, Y., Sugawara, K., Yamaji, Y., 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., Hashimoto, M., Ozeki, J., Yamaji, Y., Maejima, K., Senshu, H., Himeno, M., Okano, Y., Kagiwada, S., Namba, S. (2010) Viral-induced systemic necrosis in plants involves both programmed cell death and the inhibition of viral multiplication, which are regulated by independent pathways. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 283-293
- Komatsu, K., Yamaji, Y., Ozeki, J., Hashimoto, M., Kagiwada, S., Takahashi, S., 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.
- Kozak, M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**, 283-292.
- Kumakura, N., Takeda, A., Fujioka, Y., Motose, H., Takano, R. Watanabe, Y. (2009) SGS3 and RDR6 interact and colocalize in cytoplasmic SGS3/RDR6-bodies. *FEBS Lett* **583**, 1261-1266.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. (1994) MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. *Comput Appl Biosci* **10**, 189-191.
- Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E. J., Carrington, J. C., Liu, Y. P., Dolja, V. V., Calvino, L. F., Lopez-Moya, J. J., Burguán, J. (2006) Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J* **25**, 2768-2780.
- Latham, J.R., Saunders, K., Pinner, M.S., Stanley, J. (1997) Induction of plant cell division by beet curly top virus gene C4. *Plant J* **11**, 1273-1283.
- Lee, I. M., Klopmeier, M., Bartoszyk, I. M., Gundersen-Rindal, D. E., Chou, T. S., Thomson, K. L., Eisenreich, R. (1997) Phytoplasma induced free-blanching in commercial poinsettia cultivars. *Nat Biotechnol* **15**, 178-182.
- Lesemann, D.-E., Koenig, R., Huth, W., Brunt, A. A., Phillips, S., Barton, R. J. (1983) Poinsettia mosaic virus : A tymovirus ? *Phytopath Z* **107**, 250-262.

- Li, F., Ding, S. W. (2006) Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu Rev Microbiol* **60**, 503-531.
- Lico, C., Capuano, F., Renzone, G., Donini, M., Marusic, C., Scaloni, A., Benvenuto, E., Baschieri, S. (2006) Peptide display on Potato virus X: molecular features of the coat protein-fused peptide affecting cell-to-cell and phloem movement of chimeric virus particles. *J Gen Virol* **87**, 3103-3112.
- Lim, H. S., Vaira, A. M., Domier, L. L., Lee, S. C., Kim, H. G., Hammond, J. (2010a) Efficiency of VIGS and gene expression in a novel bipartite potexvirus vector delivery system as a function of strength of TGB1 silencing suppression. *Virology* **402**, 149-163.
- Lim, H. S., Vaira, A. M., Reinsel, M. D., Bae, H., Bailey, B. A., Domier, L. L., Hammond, J. (2010b) Pathogenicity of Alternanthera mosaic virus is affected by determinants in RNA-dependent RNA polymerase and by reduced efficacy of silencing suppression in a movement-competent TGB1. *J Gen Virol* **91**, 277-287.
- Liu, X., Gorovsky, M. A. (1993) Mapping the 5' and 3' ends of *Tetrahymena thermophila* mRNAs using RNA ligase mediated amplification of cDNA ends (RLM-RACE). *Nucleic Acids Res* **21**, 4954-4960.
- Liu, Z., Kearney, C. M. (2010) An efficient Foxtail mosaic virus vector system with reduced environmental risk. *BMC biotechnol* **10**, 88.
- Lockhart, B. E. L., Khaless, N., Lennon, A. M., El Maataoui, M. (1985) Properties of Bermuda grass etched-line virus, a new leafhopper-transmitted virus related to maize rayado fino and oat blue dwarf viruses. *Phytopathology* **75**, 1258-1262.
- Lu, C. C., Chen, C. E., Tsai, M. H., Wang, H. I., Su, H. J., Yeh, H. H. (2009) Cymbidium mosaic potexvirus isolate-dependent host movement systems reveal two movement control determinants and the coat protein is the dominant. *Virology* **388**, 147-159.
- Lu, R., Folimonov, A., Shintaku, M., Li, W. X., Falk, B. W., Dawson, W. O., Ding, S. W. (2004) Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15742-15747.
- Lukhovitskaya, N. I., Solovieva, A. D., Boddeti, S. K., Thaduri, S., Solovyev, A. G., Savenkov, E. I. (2013) An RNA virus-encoded zinc-finger protein acts as a plant transcription factor and induces a regulator of cell size and proliferation in two tobacco species. *Plant Cell* **25**, 960-973.
- Lütcke, H. A., Chow, K. C., Mickel, F. S., Moss, K. A., Kern, H. F., Scheele, G. A. (1987) Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *EMBO J* **6**, 43-48.
- Luo, Q. J., Mittal, A., Jia, F., Rock, C. D. (2011) An autoregulatory feedback loop involving PAP1 and TAS4 in response to sugars in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **80**, 117-129.
- Maccheroni, W., et al. (2005) Identification and Genomic Characterization of a New Virus (*Tymoviridae* Family) Associated with Citrus Sudden Death Disease. *Journal of Virology* **79**, 3028-3037.
- Masuta, C., Yamana, T., Tacahashi, Y., Uyeda, I., Sato, M., Ueda, S., Matsumura, T. (2000) Development of clover yellow vein virus as an efficient, stable gene-expression system for legume species. *Plant J* **23**,

539-546.

Matthews R. E. F. (1991) *Plant Virology*. San Diego: Academic. 835 pp.

Maule, A. J., Escaler, M., Aranda, M. A. (2000) Programmed responses to virus replication in plants. *Mol Plant Pathol* **1**, 9-15.

Maule, A. J., Leh, V., Lederer, C. (2002) The dialogue between viruses and hosts in compatible Interactions. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 279-284.

Merai, Z., Kerenyi, Z., Kertesz, S., Magna, M., Lakatos, L., Silhavy, D. (2006) Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol* **80**, 5747-5756.

Mestre, P., Brigneti, G., Baulcombe, D.C. (2000). An *Ry*-mediated resistance response in potato requires the intact active site of the Nla proteinase from potato virus Y. *Plant J* **23**, 653-661.

Mills-Lujan, K., Deom, C.M. (2010) Geminivirus C4 protein alters Arabidopsis development. *Protoplasma* **239**, 95-110.

Mlotshwa, S., Pruss, G. J., Vance, V. (2008) Small RNAs in viral infection and host defense. *Trends Plant Sci* **13**, 375-382.

Moissiard, G., Parizotto, E. A., Himber, C., Voinnet, O. (2007) Transitivity in Arabidopsis can be primed, requires the redundant action of the antiviral Dicer-like 4 and Dicer-like 2, and is compromised by viral-encoded suppressor proteins. *RNA* **13**, 1268-1278.

Montgomery, T. A., Howell, M. D., Cuperus, J. T., Li, D., Hansen, J. E., Alexander, A. L., Chapman, E. J., Fahlgren, N., Allen, E., Carrington, J. C. (2008a) Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell* **133**, 128-141.

Montgomery, T. A., Yoo, S. J., Fahlgren, N., Gilbert, S. D., Howell, M. D., Sullivan, C. M., Alexander, A., Nguyen, G., Allen, E., Ahn, J. H., Carrington, J. C. (2008b). AGO1-miR173 complex initiates phased siRNA formation in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 20055-20062.

Morel, J. B., Godon, C., Mourrain, P., Beclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F., Vaucheret, H. (2002) Fertile hypomorphic ARGONAUTE (*ago1*) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell* **14**, 629-639.

Morozov, S. Y., Zakchariev, V. M., Chernow, B. K., Prasolov, V. S., Kozlov, Y. V., Atabekov, J. G., Skryabin, K. G. (1983) The analysis of the primary structure and localization of the coat protein gene on the genomic RNA of potato virus X. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **271**, 211-215. (in Russian)

Nakazawa, Y., Hiraguri, A., Moriyama, H., Fukuhara, T. (2007) The dsRNA-binding protein DRB4 interacts with the Dicer-like protein DCL4 in vivo and functions in the trans-acting siRNA pathway. *Plant Mol Biol* **63**, 777-785.

難波成任、山下修一、土居養二 (1987) ポインセチアモザイク病より見出された小球状ウイルスについて *日本植物病理学会報* **53**, 422.

Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into



- Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* **2**, 279-289.
- Nelson, B. K., Cai, X., Nebenführ A. (2007) A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant J* **51**, 1126-1136.
- Niwa, Y., Hirano, T., Yoshimoto, K., Shimizu, M., Kobayashi, H. (1999) Non-invasive quantitative detection and applications of non-toxic, S65T-type green fluorescent protein in living plants. *Plant J* **18**, 455-463.
- Oparka, K. J., Roberts, A. G., Boevink, P., Cruz, S. S, Roberts, I., Pradel, K. S., Imlau, A., Kotlizky, G., Sauer, N., Epel, B. (1999) Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell* **97**, 743-754.
- Ozeki, J., Takahashi, S., Komatsu, K., Kagiwada, S., Yamashita, K., Mori, T., Hirata, H., Yamaji, Y., Ugaki, M., Namba, S. (2006) A single amino acid in the RNA-dependent RNA polymerase of *Plantago asiatica* mosaic virus contributes to systemic necrosis. *Arch Virol* **151**, 2067-2075.
- Ozeki, J., Hashimoto, M., Komatsu, K., Maejima, K., Himeno, M., Senshu, H., Kawanishi, T., Kagiwada, S., Yamaji, Y., 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.
- Padmanabhan, M. S., Goregaoker, S. P., Golem, S., Shiferaw, H., Culver, J. N. (2005) Interaction of the tobacco mosaic virus replicase protein with the Aux/IAA protein PAP1/IAA26 is associated with disease development. *J Virol* **79**, 2549-58.
- Padmanabhan, M. S., Shiferaw, H., Culver, J. N. (2006) The Tobacco mosaic virus replicase protein disrupts the localization and function of interacting Aux/IAA proteins. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**, 864-73.
- Pallas, V., and Garcia, J. A. (2011) How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *J Gen Virol* **92**, 2691-2705.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., Chen, X. (2002) CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* **12**, 1484-1495.
- Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H. L., Poethig, R. S. (2004) SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **18**, 2368-2379.
- Pfannenstiel, M. A., Mintz, K. P., Fulton, R. W. (1982) Evaluation of heat therapy of poinsettia mosaic and characterization of the viral components. *Phytopathology* **72**, 252-254.
- Piroux, N., Saunders, K., Page, A., Stanley, J. (2007) Geminivirus pathogenicity protein C4 interacts with *Arabidopsis thaliana* shaggy-related protein kinase AtSKeta, a component of the brassinosteroid signalling pathway. *Virology* **362**, 428-440.
- Pita, J. S., de Miranda, J. R., Schneider, W. L., Roossinck, M. J. (2007) Environment determines fidelity for an RNA virus replicase. *J Virol* **81**, 9072-9077.
- Preil, W., Koenig, R., Engelhardt, M., Meier-Dinkel, A. (1982) Eliminierung von Poinsettia mosaic virus

(PoiMV) und Poinsettia cryptic virus (PoiCV) aus *Euphorbia pulcherrima* Willd. Durch Zellsuspensionskultur. *Phytopath Z* **105**, 193-197.

Qu, F., Ye, X., Morris, T. J. (2008) *Arabidopsis* DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14732-14737.

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

Ratcliff, F., MacFarlane, S. A., Baulcombe, D. C. (1999) Gene silencing without DNA. rna-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* **11**, 1207-1216

Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B., Bartel, D. P. (2002) MicroRNAs in plants. *Genes Dev* **16**, 1616-1626.

Robertson, D. (2004) VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 495-519.

Rowland, D., Dorner, J., Sorensen, R., Beasley, J. P. Jr, Todd, J. (2005) Tomato spotted wilt virus in peanut tissue types and physiological effects related to disease incidence and severity. *Plant Pathol* **54**, 431-40.

Ruiz, M. T., Voinnet, O., Baulcombe, D. C. (1998) Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* **10**, 937-946.

Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cazares, B., Kragler, F. (2004) The plasmodesmatal transport pathway for homeotic proteins, silencing signals and viruses. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 641-650.

Schirawski, J., Voyatzakis, A., Zaccomer, B., Bernardi, F., Haenni, A. L. (2000) Identification and functional analysis of the turnip yellow mosaic tymovirus subgenomic promoter. *J Virol* **74**, 11073-11080.

Schwach, F., Vaistij, F. E., Jones, L., Baulcombe, D. C. (2005) An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiol* **138**, 1842-1852.

Sempere, R. N., Gómez, P., Truniger, V., Aranda, M. A. (2011) Development of expression vectors based on pepino mosaic virus. *Plant Methods* **7**, 6.

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

Senshu, H., Yamaji, Y., Minato, N., Shiraishi, T., Maejima, K., Hashimoto, M., Miura, C., Neriya, Y., Namba, S. (2011) A dual strategy for the suppression host antiviral silencing: two distinct suppressors for viral replication and viral movement encoded by potato virus M. *J Virol* **85**, 10269-10278.

千秋博子(2012) *Flexivirus* 科ウイルスの RNA サイレンシングサプレッサーの生物学的研究 博士学位論文 (東京大学)

Shintaku, M. H., Zhang, L., Palukaitis, P. (1992) A single amino acid substitution in the coat protein of

cucumber mosaic virus induces chlorosis in tobacco. *Plant Cell* **4**, 751-757.

Siegel, A., Hari, V., Kolacz, K. (1978) The effect of tobacco mosaic virus infection on host and virus-specific protein synthesis in protoplasts. *Virology* **85**, 494-503.

Silhavy, D., Burgyán, J. (2004) Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. *Trends Plant Sci* **9**, 76-83.

Solovyev, A.G., Novikov, V.K., Merits, A., Savenkov, E.I., Zelenina, D.A., Tyulkina, L.G., Morozov, S. (1994) Genome characterization and taxonomy of *Plantago asiatica* mosaic potexvirus. *J Gen Virol* **75** (Pt 2), 259-267.

Sonenberg, N., Shatkin, A. J., Ricciardi, R. P., Rubin, M., Goodman, R. M. (1978) Analysis of terminal structures of RNA from potato virus X. *Nucleic Acids Res* **5**, 2501-2512.

Spetz, C., Moe, R., Blystad, D. R. (2008) Symptomless infectious cDNA clone of a Norwegian isolate of Poinsettia mosaic virus. *Arch Virol* **153**, 1357-1341.

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

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

Takahashi, H., Ehara, Y. (1993) Severe chlorotic spot symptoms in cucumber mosaic virus strain Y-infected tobaccos are induced by a combination of the virus coat protein gene and two host recessive genes. *Mol Plant-Microbe Interact* **6**, 182-189.

Takahashi, S., Komatsu, K., Kagiwada, S., Ozeki, J., Mori, T., Hirata, H., Yamaji, Y., Ugaki, M., Namba, S. (2006) The efficiency of interference of Potato virus X infection depends on the target gene. *Virus Res* **116**, 214-217.

Takeda, A., Sugiyama, K., Nagano, H., Mori, M., Kaido, M., Mise, K., Tsuda, S., Okuno, T. (2002) Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus. *FEBS Lett* **532**, 75-79.

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

Teraporewala, Z. F., Culver, J.N. (1997). Structural and functional conservation of the tobamovirus coat protein elicitor active site. *Mol Plant-Microbe Interact* **10**, 597-604.

Thivierge, K., Nicaise, V., Dufresne, P.J., Cotton, S., Laliberte, J.F., Le Gall, O., Fortin, M.G. (2005) Plant virus RNAs. Coordinated recruitment of conserved host functions by (+) ssRNA viruses during early infection events. *Plant Physiol* **138**, 1822-27.

Várallyay, E., Valoczi, A., Agyi, A., Burgyán, J., Havelda, Z. (2010) Plant virus-mediated induction of

miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *EMBO J* **29**, 3507-3519.

Vargason, J. M., Szittyá, G., Burgyán, J., Hall, T. M. (2003) Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* **115**, 799-811.

Vaucheret, H. (2006) Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev* **20**, 759-771.

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

Voinnet, O., Baulcombe, D. C. (1997) Systemic signalling in gene silencing. *Nature* **389**, 553.

Voinnet, O., Lederer, C., Baulcombe, D. C. (2000) A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* **103**, 157-167.

Voinnet, O., Pinto, Y. M., Baulcombe, D. C. (1999) Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14147-14152.

Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., Baulcombe, D. (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* **33**, 949-956.

Voinnet, O., Vain, P., Angell, S., Baulcombe, D. C. (1998) Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* **95**, 177-187.

Wang, D., Maule, A. J. (1995) Inhibition of host gene expression associated with plant virus replication. *Science* **267**, 229-31.

Wang, X. B., Jovel, J., Udornporn, P., Wang, Y., Wu, Q., Li, W. X., Gascioli, V., Vaucheret, H., Ding, S. W. (2011) The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative argonautes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **23**, 1625-1638.

Wang, X. B., Wu, Q., Ito, T., Cillo, F., Li, W. X., Chen, X., Yu, J. L., Ding, S. W. (2010) RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 484-489.

Xie, Z., Allen, E., Wilken, A., Carrington, J. C. (2005) DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12984-12989.

Xu, L., Yang, L., Pi, L., Liu, Q., Ling, Q., Wang, H., Poethig, R. S., Huang, H. (2006) Genetic interaction between the AS1-AS2 and RDR6-SGS3-AGO7 pathways for leaf morphogenesis. *Plant Cell Physiol* **47**, 853-863.

Yaegashi, H., Tamura, A., Isogai, M., Yoshikawa, N. (2008) Inhibition of long-distance movement of RNA silencing signals in *Nicotiana benthamiana* by Apple chlorotic leaf spot virus 50 kDa movement protein. *Virology* **382**, 199-206.

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

Yang, J. Y., Iwasaki, M., Machida, C., Machida, Y., Zhou, X., Chua, N. H. (2008) betaC1, the pathogenicity factor of TYLCCNV, interacts with AS1 to alter leaf development and suppress selective jasmonic acid responses. *Genes Dev* **22**, 2564-2577.

Ye, K., Malinina, L., Patel, D. J. (2003) Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* **426**, 874-878.

Yoshikawa, M., Peragine, A., Park, M. Y., Poethig, R. S. (2005) A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes Dev* **19**, 2164-2175.

Zhang, X., Yuan, Y. R., Pei, Y., Lin, S. S., Tuschl, T., Patel, D. J., Chua, N. H. (2006) Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev* **20**, 3255-3268.

Zheng, Q., Ryvkin, P., Li, F., Dragomir, I., Valladares, O., Yang, J., Cao, K., Wang, L. S., Gregory, B. D. (2010) Genome-wide double-stranded RNA sequencing reveals the functional significance of base-paired RNAs in Arabidopsis. *PLoS Genet* **6**, e1001141.

Ziegler-Graff, V., Guilford, P. J., Baulcombe, D. C. (1991) Tobacco rattle virus RNA-1 29K gene product potentiates viral movement and also affects symptom induction in tobacco. *Virology* **182**, 145-155.