

博士論文

フレキシウイルスに対する高度抵抗性に関する
分子遺伝学的研究

東京大学大学院 農学生命科学研究科
生産・環境生物学専攻
植物病理学研究室

白石 拓也

指導教員：難波成任 教授

第 1 章 緒論	4
1.1 植物病とは	4
1.2 植物病の診断と防除	4
1.3 植物ウイルス	5
1.4 植物ウイルス病の診断と防除	6
1.5 細菌・糸状菌に対する植物の抵抗性	7
1.6 ウイルスに対する抵抗性機構	9
1.7 アルファフレキシウイルス科ウイルスとベータフレキシウイルス科ウイルス	11
1.7.1 フレキシウイルス科	11
1.7.2 アルファフレキシウイルス科とポテックスウイルス属	12
1.7.3 ベータフレキシウイルス科とカルラウイルス属	13
第 2 章 黒死病に感染したクリスマスローズより分離されたフレキシウイルス	14
2.1 クリスマスローズに発生する black death 病および <i>Helleborus net necrosis virus</i>	14
2.2 材料と方法	17
2.2.1 実験に用いた植物試料	17
2.2.2 病原菌の分離	17
2.2.3 電子顕微鏡観察	17
2.2.4 分子生物学的診断	17
2.2.5 接種試験	19
2.2.6 ウイルスの全長塩基配列決定および系統解析	20
2.2.7 <i>HeNNV</i> 検出 <i>RT-LAMP</i> プライマーの作成	22
2.3 結果	25
2.3.1 我が国におけるクリスマスローズ black death 症状発生の確認と <i>helleborus net necrosis virus</i> の検出	25
2.3.2 <i>HeNNV</i> 日本分離株 (<i>HeNNV-J</i>) の全長塩基配列解析および系統解析	30
2.3.3 <i>RT-LAMP</i> 法による <i>HeNNV</i> 検出手法の確立	54
2.4 考察	60
2.4.1 クリスマスローズに発生した black death 症状の診断	60
2.4.2 <i>HeNNV</i> ゲノム解析	61
2.4.3 <i>HeNNV</i> の早期検出手法の確立	63
第 3 章 ポテックスウイルスに対する抵抗性遺伝子 <i>JAX1</i> に関する研究	64
3.1 レクチン	64
3.2 材料と方法	66
3.2.1 抵抗性エコタイプのスクリーニング	66

3.2.2	抵抗性遺伝子のマッピングおよびクローニング.....	71
3.2.3	JAX1 の発現解析.....	72
3.2.4	<i>Nicotiana benthamiana</i> への JAX1 形質転換.....	73
3.2.5	接種葉レベルおよび細胞レベルの JAX1 抵抗性評価.....	74
3.2.6	HR 細胞死の検出.....	75
3.2.7	植物ホルモン経路の変異体.....	75
3.2.8	RNA サイレンシングと JAX1 抵抗性の比較で用いたコンストラクト.....	76
3.2.9	JAX1 抵抗性の範囲.....	76
3.3	結果.....	77
3.3.1	抵抗性エコタイプのスクリーニング.....	77
3.3.2	抵抗性遺伝子のマップベースクローニング.....	81
3.3.3	JAX1 の発現解析.....	88
3.3.4	異なる科の植物 <i>Nicotiana benthamiana</i> においても JAX1 はウイルス感染を強く阻害する.....	90
3.3.5	JAX1 はウイルス蓄積を細胞レベルで阻害する.....	92
3.3.6	JAX1 抵抗性は他のウイルス抵抗性と機構が異なる.....	96
3.3.7	JAX1 はポテックスウイルスに対する広域な抵抗性を付与する.....	99
3.4	考察.....	103
3.4.1	植物ウイルスに対するレクチン抵抗性.....	103
3.4.2	植物ウイルスに対するレクチン抵抗性の普遍性.....	104
3.4.3	植物ウイルスに対するレクチン抵抗性の機構.....	105
3.4.4	JAX1 抵抗性の作用機構についての今後の研究展開.....	107
3.4.5	新たな抵抗性遺伝子の可能性.....	107
	摘要.....	109
	引用文献.....	112
	謝辞.....	122

略語一覧

ABRC	Arabidopsis Biological Resource Center
AlkB	alkylated DNA repair protein
Avr	avirulence
Bay-0	Bayreuth-0 (シロイヌナズナエコタイプ)
BYL	evacuolated tobacco protoplast extract
CLRs	c-type lectin receptors
Col-0	Columbia-0 (シロイヌナズナエコタイプ)
CP	coat protein
CTAB	cetyltrimethylammonium bromide
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DAI	day after inoculation
Dra-2	Drahonin-2 (シロイヌナズナエコタイプ)
dsRNA	double-stranded RNA
Eil-0	Eilenburg-0 シロイヌナズナエコタイプ
ETI	effector-triggered immunity
FIP	forward inner primer
FLP	forward loop primer
FOP	forward outer primer
Ga-0	Gabelstein-0 (シロイヌナズナエコタイプ)
GFP	green fluorescent protein
GUS	β -glucuronidase
HEL ドメイン	helicase domain
HR	hypersensitive response
Is-1	Isenburg-1 (シロイヌナズナエコタイプ)
JAX1	jacalin-type lectin required for potyvirus resistance 1
LAMP	loop-mediated isothermal amplification
Ler	Landsberg erecta (シロイヌナズナエコタイプ)
LMR	lectin-mediated resistance
LRR	leucine-rich repeat
MATH	mepripin and TRAF homology
MET ドメイン	methyltransferase domain
MP	movement protein
NA	nutrient agar

NABP	nucleic acid binding protein
NBS	nucleotide-binding site
NLR	nucleotide-binding leucine-rich repeat
NLR 抵抗性	NLR-mediated resistance
P-Pro	papain-like protease
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
POL ドメイン	polymerase domain
PRR	pattern recognition receptor
PR タンパク質	pathogenesis-related protein
PTI	pattern-triggered immunity
R	resistance
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase
RIP	reverse inner primer
RLP	reverse loop primer
ROP	reverse outer primer
RTM	restricted TEV movement
siRNA	small interference RNA
SNP	single nucleotide polymorphism
SSLP	simple sequence length polymorphism
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
TGBp	triple gene block protein
TMD	trans membrane domain
WA	water agar

ウイルス略称

AcLV	aconitum latent virus
AV3	asparagus virus3
BlScV	blueberry scorch virus
ButMV	butterbur mosaic virus
CLV	carnation latent virus
CMV	cucumber mosaic virus
CVB	chrysanthemum virus B
CVNV	choleus vein necrosis virus
DVS	daphne virus S
GarCLV	garlic common latent virus

GarLV garlic latent virus
GarV-A garlic virus A
HeNNV helleborus net necrosis virus
HipLV hippeastrum latent virus
HpLV hop latent virus
HpMV hop mosaic virus
LNRSV ligustrum necrotic ringspot virus
LSV lily symptomless virus
NCLV narcissus common latent virus
NSV narcissus symptomless virus
PhVB phlox virus B
PlAMV plantago asiatica mosaic virus
PLV passiflora latent virus
PopMV poplar mosaic virus
PVM potato virus M
PVP potato virus P
PVS potato virus S
PVX potex virus X
PVY potato virus Y
RaMV radish mosaic virus
RCVMV red clover vein mosaic virus
SMV soybean mosaic virus
SPCFV sweet potato chlorotic fleck virus
TBSV tomato bushy stant virus
TEV tomato etch virus
TMV tobacco mosaic virus
ToMV tomato mosaic virus
TRV tobacco rattle virus
TuMV turnip mosaic virus
TYLCV tomato yellow leaf curl virus
WCIMV white clover mosaic virus

第1章 緒論

1.1 植物病とは

植物は地球上の、特に地上の生物の生命活動を支える基盤であり、植物を欠いては現在の生態系は成り立たない。なかでも人類は他の生物以上に、その生活を植物に依拠している。すなわち食糧として植物を摂取するだけでなく、衣料、医薬品、嗜好品、園芸など、およそ人間的な活動のほとんどが植物を必要としている。植物病とは、人間が植物を利用しようとするとき、様々な原因で人間の利用に適さなくなった植物の状態の総称である。具体的な植物病の原因としては、菌類、細菌、ファイトプラズマ、線虫などの微生物やウイルス、ウイロイドの他に、昆虫などによる食害（虫害）や雑草との競合による雑草害、あるいは不適な栽培環境による障害（生理障害）などがある。

先に述べたように植物はあらゆる生物の活動の基盤であり、植物をとりまく環境には様々な生物が存在している。この中には植物に病気を引き起こす菌類、細菌、ファイトプラズマ、線虫などの微生物やウイルス、ウイロイドが存在する。これらによる病気は感染性であり、一度発生すると感染が新たな植物へと広がり大きな被害を引き起こすことがある。よって、植物病の中でも微生物による病気は速やかに発生を確認した上で早急に感染植物の除去などの対策を講じなければならない。このとき重要になるのが迅速かつ正確な診断である。また、微生物による病気は発生が確認された後、対策が有効になるまでに大きな被害が出る。よって、出来る限りその発生を未然に防ぐことが求められる。これを植物病の防除とよび、様々な防除対策が研究され試みられている。次節では、植物病の診断と防除について詳しく記す。

1.2 植物病の診断と防除

植物に病害が発生した際、何らかの対策を講じる必要がある。しかしその原因が分からなければ、適切に対処することはできない。特に、感染性の病気であれば早急な対策が必要であるが、病原体の種類によって対処法は異なる。よって診断の第一の目的は病気の原因を明らかにすることである。また、ある一つの病気でも発生状況によって、採るべき対処方法が異なることもある。従って、発生状況や被害状況を把握し、適切な対処法を立案することが診断の最終的な目的である。

まず、微生物による感染性の病気なのかそれ以外の原因によるものかを判断することは防除対策を立てる上で欠かせない。ある微生物がある特定の病害の原因となる病原体であると判定するためには、一般にコッホの原則を満たさなければならない。コッホの原則は、ドイツの医学者 Robert Koch が提唱したもので、本来は動物の疾病の病原確認の際の指針のひとつである

が、植物の微生物病にも準用されている（難波，2008）。コッホの原則とは、①特有の症状を持つ病気が発生し、その病患部に特定の微生物が検出されること、②その微生物が罹病植物から純粋に分離され、培養されること、③分離・培養した微生物を健全な植物に人工的に接種し、原病徴が再現されること、④接種により再現された病患部から接種源と同一の微生物が再び検出されること、の 4 つの条件からなる。これは未知病害が発生したときの病原を決めるための原則であって、既知病害の場合③④は省略されることが多い。

植物病の防除は、耕種的防除、物理的防除、生物的防除、化学的防除に分けられる（難波，2008）。耕種的防除は追肥や除草、温度・湿度の管理など栽培条件を整えるもので、病原体に対する抵抗性作物を利用することもこれに含まれる。物理的防除は、害虫の駆除や、罹病植物の駆除、遮断、残渣の処理などがある。生物的防除は微生物農薬や天敵昆虫を用いる方法である。化学的防除は化学合成農薬を中心とした防除法で、植物病に対して広く用いられる方法である。ある病害の原因が判明した後、これらの防除から有効な方法を選び組み合わせることで防除対策を立てることになる。

1.3 植物ウイルス

植物病を引き起こす病原体の一つに植物ウイルスがある。ウイルスをどう定義するかについては議論があるが(Raoult and Forterre, 2008、Koonin and Dolja, 2014)、多くのウイルスは外被タンパク質 (coat protein; CP) と呼ばれる構造に核酸が包まれた粒子と呼ばれる形態をとる。あるウイルス種を構成する核酸は 1 分子から数分子の RNA または DNA であり、これをウイルスのゲノムと呼ぶ。ゲノム核酸の種類によってウイルスは、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。ウイルスは自身の細胞を持たず、宿主細胞内でのみ自身のゲノムを増殖することができる。ゲノムには宿主細胞への感染に必要ないくつかのタンパク質がコードされている。

植物ウイルスは植物細胞内あるいは昆虫細胞内で増殖できるウイルスである（池上ら，2009）。植物ウイルス全体のおよそ 70% 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。植物ウイルスの粒子は細胞表面の傷口や媒介昆虫を介して宿主である植物細胞内に侵入し、ゲノム核酸から CP が解離して (脱外被)、感染を開始する。まず、ウイルスは植物細胞の翻訳機構を利用してゲノム上にコードされたタンパク質を翻訳し、ウイルスゲノムを複製する。RNA ウイルスの場合、複製に必要な RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) を複製酵素として自身のゲノムにコードしている。初期感染細胞で増殖したウイルスは原形質連絡 (プラズモデスマータ) を介して隣接細胞に移行する。この過程を細胞間移行と呼ぶ。多くのウイルスがこの細胞間移行を担う移行タンパク質 (movement protein; MP) をゲノム上に有する。細胞間移行を繰り返し初期感染細胞から

周辺細胞へと感染を拡げた後、ウイルスは維管束系へと到達し、維管束系を介して植物体全身へ移行する。この過程を長距離移行と呼ぶ。

植物ウイルスの伝染は昆虫などによる媒介生物による伝染、種子や花粉、栄養繁殖器官、接ぎ木を介した伝染、汁液の接触による伝染に分けられる（池上ら，2009）。汁液による伝染は細胞表面の傷口から起こるため、剪定器具を介して起こることが多い。吸汁昆虫による伝染の場合、ウイルスは昆虫の口針を通して植物の篩部細胞に注入される。

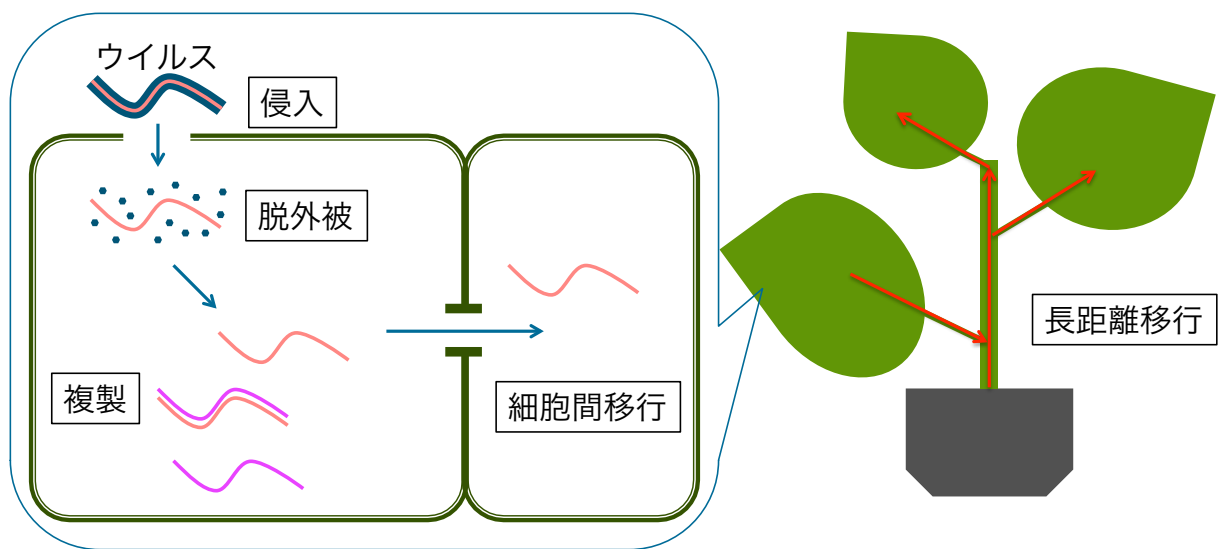


図 1.1 植物ウイルスの感染過程

ウイルスは植物細胞の傷口から、もしくは媒介虫により細胞内に侵入する。その後、脱外被を経て自身のゲノムを複製する。ある程度蓄積すると、原形質連絡を通り隣接細胞に細胞間移行する。篩部細胞に到達したウイルスは、篩管流によって植物体全身へ長距離移行する。

1.4 植物ウイルス病の診断と防除

作物生産の植物病による損失額は年間 600 億ドルに及ぶと考えられているが、その中でもウイルス病は菌類病に次いで 2 番目に大きな被害を与えている (Reddy et al., 2009)。植物ウイルスは植物体内で増殖し、媒介虫等により伝搬されるため、地域全体における特定の作物生産に壊滅的な被害を与えることが多い。また、植物ウイルスには、感染していても軽微な病徴しか引き起こさない事例や、無病徴で潜在感染する事例も知られている。生理障害と見分けがつきにくい場合もあり、ウイルス病と知らずに適切な処置がなされないことも多い。ウイルスは感染植物体内で自身のゲノム中に容易に変異を蓄積するという特徴を有するため、突如としてこれまでにない激しい病徴を引き起こすことや、新たな植物に感染可能になることもある。また、異なる 2 種類以上のウイルスが同一宿主に重複感染することにより病徴が劇化する事例も多数存在する。従

って、新たなウイルス病のパンデミック（大流行）を抑止するためにも、早期の診断によりウイルスの発生を確実に発見しウイルスの蔓延や被害の拡大を阻止するよう対策を講じなくてはならない。

ウイルス病の主な診断手法として、電子顕微鏡を用いた検鏡による診断法、検定植物に対する接種結果（病徴）をもとに判定する生物学的診断法、病原微生物のゲノム塩基配列情報を利用した分子生物学的診断法、抗原抗体反応を応用した血清学的診断法が挙げられる（池上ら、2009）。これらの手法を組み合わせることで、ある特定の病害とウイルスの組み合わせにおいてコッホの原則を満たした場合に、試験に供したウイルスがその病害の病原体であると判定することができる。

菌類病や細菌病に対しては、治療や防除・予防に有効な農薬が開発されているが、ウイルス病に対しては、農薬として用いる有効な薬剤は無い（池上ら、2009）。これは、上述したようにウイルスが自身では増殖システムを完結できず、宿主の代謝系に依存して増殖することから、ウイルス増殖のある過程を特異的に阻害することが難しいためである。従って、ウイルス病の拡大をいち早く阻止するために取りうる手段は感染植物の除去や媒介生物の駆除などの物理的防除法に限られるため、迅速な診断技術の開発やウイルスの伝染経路の解明がウイルス病防除において肝要となる。

また、植物が本来有する病害抵抗性を利用してウイルス病を防除する耕種的な方法もある。実際に、育種により抵抗性遺伝子を導入したウイルス抵抗性品種が作出され、農業現場で広く用いられている。現在、抵抗性品種に広く用いられている抵抗性遺伝子は、対応するウイルス種が有する特異的なウイルスタンパク質を認識することで抵抗性を発揮するものが多い（Zereva and Pooggin, 2012）。よって全てのウイルス病を防ぐためには、全てのウイルスに対する抵抗性遺伝子が必要となるが、ウイルスの種が多いため現実的ではない。また、このような抵抗性は、抵抗性遺伝子産物による認識を避けるような変異ウイルスの出現により打破されてしまう点も問題である（Harrison, 2002）。よって持続性が高く、より広域な病原体に対して有効な抵抗性を発見し実用化することが求められている。

1.5 細菌・糸状菌に対する植物の抵抗性

植物は環境中で常に様々な微生物に晒されており、この中には植物に感染し得るものが存在する（Chisholm et al., 2006）。これに対し植物は多層的な防御戦略を備えている（Muthamilarasan and Prasad, 2013）。第一のレイヤーは葉のワックス層、細胞壁、クチクラ脂質などの物理的構造や植物細胞に含まれる抗菌物質などの二次代謝産物である。この抵抗性を打破した病原体を認識し誘導する抵抗性が第二のレイヤーである。この第二のレイヤーのよ

うに、何らかの防御反応を誘導する抵抗性を動的（能動的）抵抗性と呼ぶ（Muthamilarasan and Prasad, 2013）。「植物免疫（plant immunity）」は普通この第二のレイヤーを指す（Jones and Dangl, 2006）。植物免疫もさらに2つのレイヤーに分けて考えられており、これらを担うのが細胞表面および細胞内の受容体である。植物は、これらの受容体を介して病原体の存在を認識することで防御応答を引き起こす（Dodds and Rathjen, 2010）。植物免疫の第一のレイヤーは細胞表面の受容体により細菌や糸状菌の共通分子パターン（pathogen-associated molecular patterns; PAMPs）を認識することで引き起こされる防御応答である。この受容体を pattern recognition receptor (PRR)、防御応答を pattern-triggered immunity (PTI) と呼ぶ。PAMPs は病原体の生存に必須の構造であり、例えば細菌では鞭毛の構成タンパク質 flagellin が、菌類では細胞壁の構成成分であるキチンが PRR に認識される。よって PTI は広範な病原体を標的とした特異性の低い防御応答である。PTI はイオンの漏出、過酸化水素 (H_2O_2) などの活性酸素種の蓄積、種々の感染特異的タンパク質（pathogenesis-related protein; PR タンパク質）の産出などを伴う複合的な反応である（Spoel and Dong, 2012）。他方で、病原体はこのような PTI を抑制するために種々のエフェクターを分泌する。エフェクターは PRR による認識を妨げるものや、細胞内の PTI 誘導シグナルカスケードを阻害するものなどがあり（Chisholm et al., 2006）、その作用機構は病原体の種によって様々である。植物免疫の第二のレイヤーは植物がこのエフェクターを直接、または間接的に認識することで誘導される防御応答である。この認識を担うのが細胞内のレセプターであり、そのほとんどが核酸結合ドメイン（nucleotide-binding site; NBS）およびロイシンリッチリピート（leucine-rich repeat; LRR）を有する NLR（nucleotide-binding leucine-rich repeat）型タンパク質である（Dangl et al., 2013）。エフェクターの認識を契機に誘導される防御応答を effector-triggered immunity (ETI) と呼ぶ。PTI が広範な病原体に対する非特異的な防御応答を担うのに対し、ETI はある病原体の種の、中でも一部のレース（race）が生産するエフェクターを認識したときにのみ引き起こされる特異性の高い防御応答となる。古典的な抵抗性研究においては、植物が抵抗性遺伝子座 *R* (resistance) を、病原体がそれに対応する非病原性遺伝子座 *Avr* (avirulence) を有している場合に、ある植物がある病原体の種に抵抗性を有するとされている。近年の研究によりこの *Avr* 遺伝子がエフェクターを、*R* 遺伝子が細胞内受容体 NLR 型タンパク質をコードする例が多いことが明らかにされてきた（Dangl et al., 2013）。NLR が関わる抵抗性を特に NLR 抵抗性（NLR-mediated resistance）と呼ぶことがある。ETI は PTI と似た反応を引き起こすが、より速い反応で程度が激しく、しばしば過敏感反応（hypersensitive response; HR）と呼ばれる細胞死を伴う（Dodds and Rathjen, 2010）。PTI および ETI で引き起こされる反応は植物ホルモン、特にサリチル酸、ジャスモン酸、エチレンによって調整されている（Dodds and Rathjen, 2010）。また、サリチル酸を介して、初期感染細胞での防御応答は全身に伝達され、全身獲得抵抗性（systemic-acquired resistance）と呼ばれる抵抗性が誘導される。以上のような植物が有する防御システムとそれをかいくぐる病原体との関係は、植物と病原体の軍拡競争により進化、獲

得されてきたものだと考えられている (Jones and Dangl, 2006)。

1.6 ウイルスに対する抵抗性機構

植物ウイルスは細胞表面の傷口や媒介昆虫によって直接細胞内に侵入するため、植物細胞表面の受容体を介して直接認識される事例はこれまでに報告されていない (Ronde et al., 2014)。一般に、植物ウイルスに対する動的抵抗性は細胞内でウイルスを認識することで誘導される。動物ではウイルスに対する PRR が存在し、ウイルスの PAMPs として、二本鎖 RNA (dsRNA; double-stranded RNA)、一本鎖 RNA、DNA などが認識される (Zvereva and Poogin, 2012)。植物ではウイルスに対する PRR は知られていないが、RNA ウイルスに由来する dsRNA 構造を認識するシステムとして RNA サイレンシングを備えている (Zvereva and Poogin, 2012)。dsRNA は一般的に RNA ウイルスの感染過程で必ず生じる構造であることから、dsRNA を植物 RNA ウイルスの PAMPs とし、RNA サイレンシングを PTI と考えることもある (Nakahara et al., 2012)。RNA サイレンシングではウイルス由来の dsRNA が認識されたのち、dsRNA から生じた small interference RNA (siRNA) と相補的な配列を切断することで、ウイルスの蓄積が阻害される (Soosaar et al., 2005)。ほとんどのウイルスは RNA サイレンシングを抑制するためのタンパク質、RNA サイレンシングサプレッサーをゲノムにコードしている。

細胞内でウイルスを認識する受容体として NLR 型タンパク質がある。NLR 型タンパク質は上述の ETI においては病原体のエフェクターを認識する細胞内受容体であるが、細胞内でウイルスゲノムから翻訳されたタンパク質を認識する受容体でもある。NLR 遺伝子はウイルスに対する免疫においても、ウイルス種特異的な抵抗性を担っており、様々なウイルスに対する R 遺伝子が NLR 型タンパク質をコードすることが示されている (Zvereva and Poogin, 2012)。対応する Avr はウイルスの CP、MP、複製酵素、サイレンシングサプレッサーなど多様である。ウイルスに対する NLR 抵抗性でも細菌や糸状菌に対する ETI と同様の防御応答を誘導し、しばしば HR を伴う。このような抵抗性は、ウイルスの感染拡大を阻止するために複数の細胞で抵抗性が誘導されるため、組織レベルの抵抗性と呼ぶことができる。NLR 抵抗性の中には HR を伴わないものもある。例えば、potato virus X (PVX) に対するジャガイモの R 遺伝子、Rx による抵抗性である。Rx は NLR 型タンパク質をコードしており、対応する Avr は PVX の CP である (Bendahmane et al., 1999)。Rx が CP を認識すると、他の NLR 抵抗性とは異なり、細胞死を伴わずに初期感染細胞で速やかにウイルス蓄積を阻害する防御応答が誘導される (Bendahmane et al., 1999)。このような抵抗性を高度抵抗性 (extreme resistance) と呼ぶ。その抵抗性の実体は未だ明らかになっていないが、Rx 抵抗性はプロトプラストにおいてもウイルス蓄積を阻害することが示されていることから (Kohm et al., 1993)、細胞レベルの抵抗性と呼ぶことができる。

植物ウイルスに対する *R* 遺伝子には NLR 型タンパク質とは異なるタンパク質をコードし、RNA サイレンシングとも NLR 抵抗性とも異なる機構でウイルス感染を阻害する抵抗性が知られている。一つが tomato mosaic virus (ToMV) に対するトマト (*Solanum lycopersicum*) の抵抗性遺伝子 *Tm-1*、もう一つが tobacco etch virus (TEV) に対するシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の *RTM1* である。*Tm-1* は Rx と同様に細胞レベルでウイルス蓄積を阻害することが示されている。ToMV はトバモウイルス属 (Genus *Tobamovirus*) に属するウイルスである。*Tm-1* に対する Avr は複製酵素であるが、その作用機構は NLR 抵抗性の様に Avr の認識後に抵抗性反応を誘導する動的抵抗性ではない。*Tm-1* は複製酵素と結合することでその機能を直接阻害するタンパク質であることが示されている (Ishibashi et al., 2007, Ishibashi et al., 2013)。何らかの防御応答を誘導する動的抵抗性に対して、*Tm-1* のような作用機作を持つ抵抗性を「静的抵抗性」と呼ぶ (石橋ら, 2007)。一方、*RTM1* はジャカリンレクチンタンパク質である (Mahajan et al., 1998)。TEV はポティウイルス属 (Genus *Potyvirus*) に属するウイルスである。*RTM1* 抵抗性は TEV の長距離移行を阻害することが示されているが (Chisholm et al., 2000)、その詳細な機構は明らかにされていない。*RTM1* 抵抗性には複数の因子が関与する。*RTM1* 以外に *RTM2* および *RTM3* が関与し、*RTM2* は small heat shock protein を *RTM3* は meprin and TRAF homology (MATH) ドメインを含むタンパク質をコードすることが示されている (Whitham et al., 2000, Cosson et al., 2010)。さらに同じく *RTM1* による抵抗性に必要な遺伝子座として *RTM4*、*RTM5* が存在することが見出されているが、コードするタンパク質については不明である (Cosson et al., 2012)。

また、あるウイルスの感染に必要な宿主因子の欠損あるいは変異が、そのウイルスに対する抵抗性を付与することもある。このような抵抗性は劣性遺伝することから劣性抵抗性と呼ばれる。これに対し、*R* 遺伝子による抵抗性は優性抵抗性と呼ばれる。

本研究では、植物ウイルス病に対する高度抵抗性を利用した効果的なウイルス防除法の確立を目指し、新たなウイルス抵抗性遺伝子の探索を行った。その結果、ポテックスウイルス属 (Genus *Potexvirus*) に対する抵抗性遺伝子 *JAX1* を同定した。*JAX1* はジャカリンレクチンタンパク質をコードしていた。

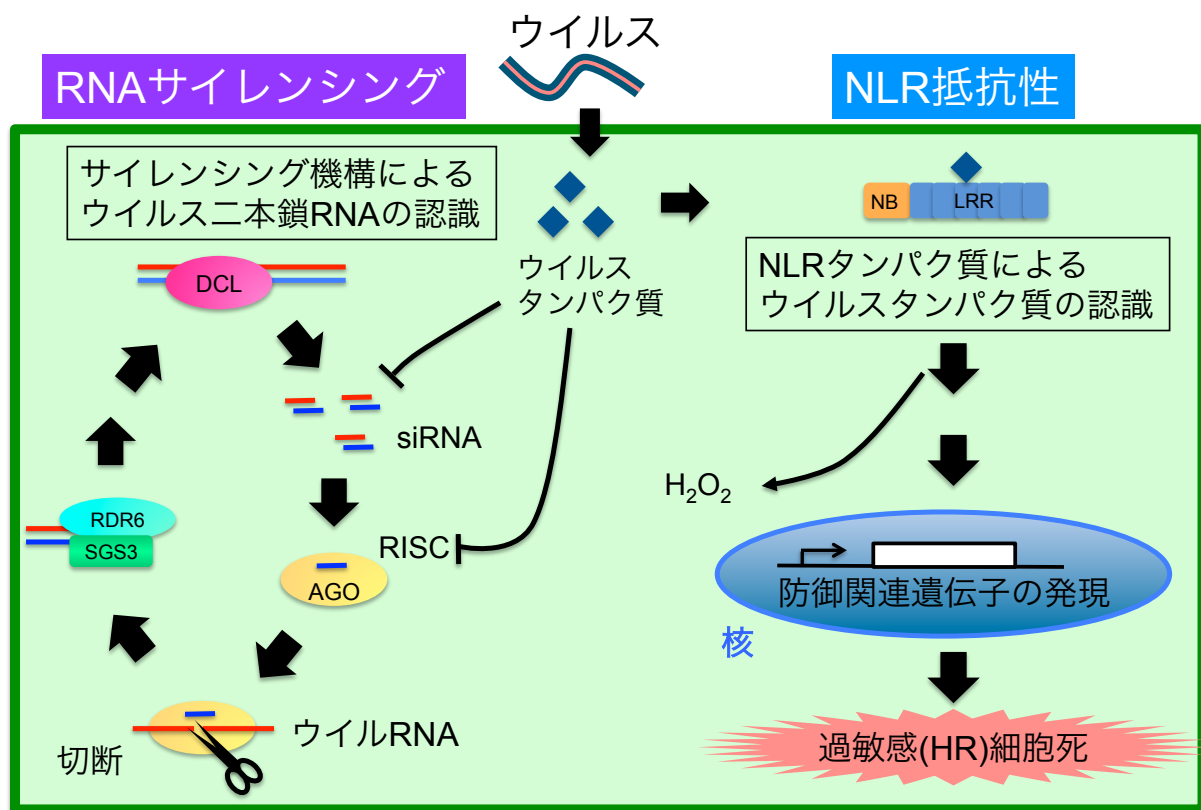


図 1.2 植物ウイルスに対する防御機構

植物ウイルスに対して植物が有する防御機構は主に RNA サイレncing と NLR 抵抗性で成り立っていると考えられている。RNA サイレncing はウイルスの二本鎖 RNA を認識することで、NLR 抵抗性は NLR 型タンパク質が対応するウイルスタンパク質を認識することで誘導される。

1.7 アルファフレキシウイルス科ウイルスとベータフレキシウイルス科ウイルス

植物ウイルスの分類は、宿主域、伝染方法、ウイルスの粒子形状、血清反応、理化学的性状などの所見に加え、ウイルスゲノム核酸の塩基配列情報が基準として用いられている。特に昨今では、塩基配列情報が優先的な分類基準となりつつある。国際ウイルス分類委員会 (International Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV) によりこれらの知見を統合した、目 (order)、科 (family)、亜科 (sub-family)、属 (genus)、種 (species) の階層構造による分類が行われている。

1.7.1 フレキシウイルス科

フレキシウイルス科 (Family *Flexiviridae*) は直鎖状プラス一本鎖の RNA をゲノムとしてもち、粒子が直径 10~15 nm、長さ 470~1,000 nm のひも状のウイルスが属するウイルス科とし

て2005年のICTV Virus Taxonomy 第8次レポートに登録されていた (Fauquet et al., 2005)。その後、複製酵素の全長アミノ酸配列に基づく系統解析により、既存のフレキシウイルス科は2つのグループに分かれることが明らかになった。また、全てのプラス鎖 RNA ウイルスの複製酵素に基づいた系統解析において、フレキシウイルス科は小球状のウイルス粒子を有するティモウイルス科 (Family *Tymoviridae*) と近縁であることが明らかになった。以上のような経緯を経て、2008年のVirus Taxonomy 第9次レポートでは、新設のティモウイルス目 (Order *Tymovirales*) の下にアルファフレキシウイルス科 (Family *Alphaflexiviridae*)、ベータフレキシウイルス科 (Family *Betaflexiviridae*)、ガンマフレキシウイルス科 (Family *Gammaflexiviridae*) およびティモウイルス科 (Family *Tymoviridae*) の4科が設けられた (King et al., 2012)。

1.7.2 アルファフレキシウイルス科とポテックスウイルス属

アルファフレキシウイルス科は、本研究の第3章で扱ったポテックスウイルス属 (Genus *Potexvirus*) が属するウイルス科である。直鎖状プラス1本鎖RNAをゲノムとしてもち、直径12~13 nm、長さ470~800 nmのひも状粒子を形成する。ゲノムRNAは5.9~9.0 kbで、5'末端にm⁷G^{5'}ppp5'Np構造 (GTPのグアニンの7位がメチル化されたキャップ構造)、3'末端にpoly A配列を有する。ゲノム上には属により5つもしくは6つのORFを有する。短い5'非翻訳領域(untranslated region; UTR)に続くORF1には複製酵素がコードされている。複製酵素にはmethyltransferase (MET)、helicase (HEL)、polymerase (POL) ドメインが保存されており、いくつかのウイルスはこれらに加え、alkylated DNA repair protein (AlkB) ドメインを有する。植物に感染するアルファフレキシウイルス科ウイルスはORF2~4にトリプルジーンブロックタンパク質 (triple gene block proteins; TGBp) をコードしており、これらは細胞間移行に関わる。ORF5には外被タンパク質CPをコードしている。アレキシウイルス属 (Genus *Allexivirus*)、ロラウイルス属 (Genus *Lolavirus*)、マンダリウイルス属 (Genus *Mandarivirus*) のウイルスはORF6に核酸結合タンパク質 (nucleic acid binding protein; NABP) をコードしている。

本論文第3章ではポテックスウイルス属ウイルス (以下ポテックスウイルス) である *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) に対する抵抗性遺伝子を同定した。ポテックスウイルスは直径13 nm、長さ470~580 nmのひも状粒子をもち、プラス1本鎖ゲノムRNAは約5.9~7.0 kbで5つのORFが存在し、それぞれ複製酵素、TGBp1、2、3、CPをコードする。複製酵素のみがゲノムRNAからリボソームにより直接翻訳される。タイプ種である *Potato virus X* (PVX) ではゲノムから2種類のサブゲノムRNAが産生され、それぞれからTGBp、CPが翻訳されることが示されている。ポテックスウイルス属は単子葉、双子葉植物の広範な植物に感染するが、それぞれの種の宿主域は比較的限られる。

1.7.3 ベータフレキシウイルス科とカルラウイルス属

ベータフレキシウイルス科は、本研究の第2章で扱ったカルラウイルス属 (Genus *Carlavirus*) が属するウイルス科である。直鎖状プラス1本鎖RNAをゲノムとしてもち、直径12~13 nm、長さ600~1000 nm以上のひも状粒子を形成する。ゲノムRNAは5.9~9.0 kbで、5'末端にm⁷G^{5'}ppp5'Np構造、3'末端にpoly A配列を有する。ゲノム上には属により3~6つのORFを有する。全てのベータフレキシウイルス科ウイルスで短い5'UTRに続くORF1に複製酵素がコードされている。複製酵素にはMET、HEL、POLドメインが保存されており、ほとんどのウイルスはこれらに加え、AlkBドメインおよびpapain-like protease (P-Pro)ドメインをMETとHELドメインの間に有する。その他のORF上には細胞間移行に関わるタンパク質がコードされており、カピロウイルス属 (Genus *Capillovirus*)、シトリウイルス属 (Genus *Citrivirus*)、トリコウイルス (Genus *Trichovirus*) およびビチウイルス属 (Genus *Vitivirus*) のウイルスでは単一のMPを有し、その他の属のウイルスはORF2~4にTGBpをコードしている。これらの下流のORFにはCPがコードされており、カルラウイルス属ウイルス、ビチウイルス属ウイルスおよびいくつかのトリコウイルス属ウイルスでは最も3'末端側のORFにNABPをコードしている。

本論文第2章ではカルラウイルス属ウイルス (以下カルラウイルス) である *Helleborus net necrosis virus* (HeNNV) による病害を診断し、HeNNVのゲノムを解析した。カルラウイルス属はベータフレキシウイルス科に属する。カルラウイルスは直径12~15 nm、長さ610~700 nmのひも状粒子をもち、プラス1本鎖ゲノムRNAは8.3~8.7 kbで6つのORFが存在し、それぞれ複製酵素、TGBp1、2、3、CP、NABPをコードする。複製酵素のみがゲノムRNAからリボソームにより直接翻訳される。その他のORFはゲノムから産生される2種類のサブゲノムRNAから翻訳される。一般的にそれぞれのウイルスの宿主範囲は狭いが、中には広い範囲の実験宿主に感染することが報告されているものもある。ほとんどのカルラウイルスはアブラムシによって非永続的に伝搬されることが知られている。

第2章 黒死病に感染したクリスマスローズより 分離されたフレキシウイルス

2.1 クリスマスローズに発生する black death 病および *Helleborus net necrosis virus*

クリスマスローズ (*Helleborus* spp.) はキンポウゲ科 (*Ranunculaceae*) に属する常緑の多年草である。クリスマスローズの原種はいくつか種類があり、ヨーロッパや中国などに広く自生している。晩冬から初春にかけて開花することから園芸家の中で冬の庭を彩る観賞用植物として好まれる (Burrell and Tyler, 2006)。花のように見える観賞部は植物学上「がく」に当たる部分であるため、比較的観賞期間が長い (図 2.1)。また、栽培が比較的容易で様々な交雑種 (*Lenten rose*, *H. x hybridus*) が作出されていることなどから愛好家も多い。

クリスマスローズに発生する植物病として、black death disease (以下 black death 病) が近年海外で広く問題となっている。black death 病は 1990 年代初頭に欧州諸国での発生が初めて文献に記載された (Rice and Strangman, 1993)。病徴は、展開直後の葉の葉脈に沿って黒変が生じるほか、茎およびがくに黒変を生ずる場合がある (図 2.2)。black death 病の原因については長らく不明のままであったが、2004 年に米国の研究グループが同症状を示すクリスマスローズよりウイルスを分離したことを報告した (Eastwell et al., 2004)。分離されたウイルスはその CP のアミノ酸配列からカルラウイルスに近縁のウイルスであることが示された。さらに、2009 年には同研究グループがこのウイルスの全長塩基配列を決定し、本ウイルスがカルラウイルス属に分類される新種のウイルスであることを示し、*Helleborus net necrosis virus* (HeNNV) と命名した (Eastwell et al., 2009)。その後、米国の G5、H6 分離株の全長配列が決定されたほか、I6 分離株の部分配列が決定されている (Eastwell et al., 2009)。次いで、2010 年ニュージーランドでもクリスマスローズから HeNNV が分離され (NZ 分離株)、部分塩基配列が決定されている (Liefting et al., 2010)。

このように、black death 病の症状を示すクリスマスローズから HeNNV が分離されることから、black death 病と HeNNV の強い関連性が示唆されている。しかし人工接種により感染に成功したという例はなく、クリスマスローズへの自然感染が報告されているのみで、HeNNV が black death 病の病原であるかどうかは不明である (Eastwell et al., 2009、Liefting et al., 2010)。

これらのカルラウイルス属に関する知見から HeNNV のゲノム上にも 6 つの ORF が保存され

ていると推定されており、5'末端側から順に RdRp、TGBp1、2、3、CP、NABP をコードしていると考えられた (Eastwell et al., 2009、図 2.3)。

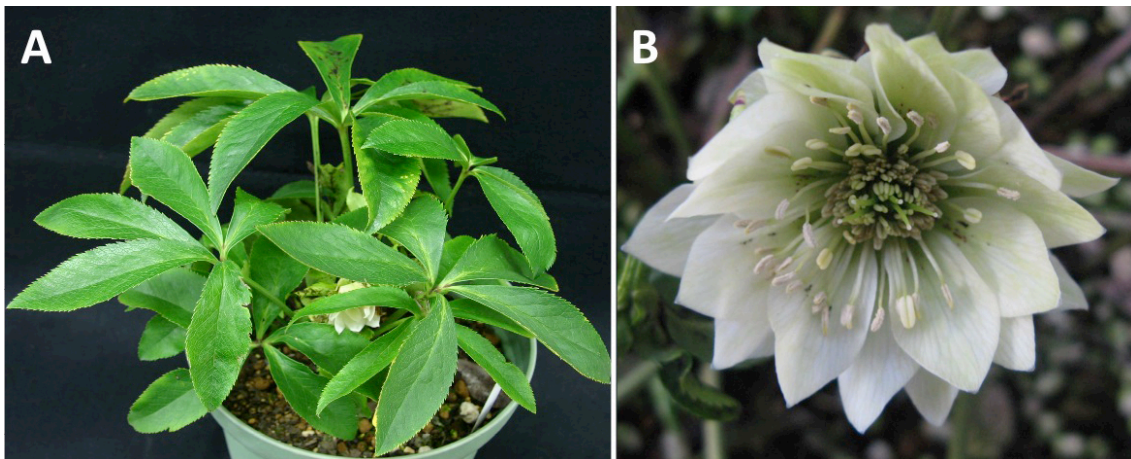
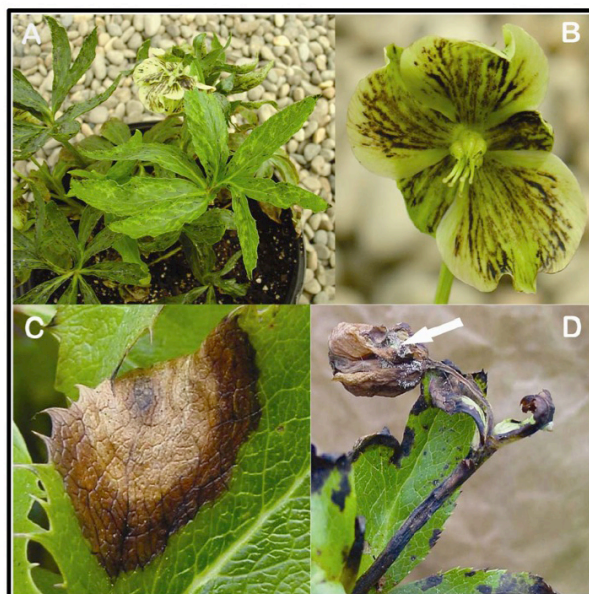


図 2.1 クリスマスローズ

A. クリスマスローズ植物体、B. がく；花のように見える観賞部はがくである



(Eastwell et al., 2009)

図 2.2 クリスマスローズ black death 病の症状と病原菌類による病徴 (Eastwell et al., 2009)

(A) black death 病の症状；葉脈に沿った黒変症状。

(B) black death 病の症状；がくに生じた黒変症状。

(C) *Coniothyrium helleborii* (菌類) による黒死病斑に類似した葉の褐変症状。

(D) *Botrytis cinerea* (菌類) による病徴。葉や茎、がくが枯死し、組織上に胞子が形成している (矢印)。



図 2.3 helleborus net necrosis virus の推定ゲノム構造 (Eastwell et al. 2009)

RdRp; RNA-dependent RNA polymerase (複製酵素)、TGBp; triple gene block protein、CP; coat protein (外被タンパク質)、NABP; nucleic acid binding protein (核酸結合タンパク質)

2.2 材料と方法

2.2.1 実験に用いた植物試料

東京都のクリスマスローズ (*Helleborus* spp.) 生産圃場において、植物体の黒変症状や茎葉の奇形を伴う本邦未記載の病害の発生が確認され、生産者より東京大学植物病院に依頼があり診断を行った。本病の症状は、海外で報告のあるクリスマスローズ black death 病に類似していた。

2.2.2 病原菌の分離

菌類の感染有無を判定するため、組織分離を行った。組織分離とは、植物の感染組織を水寒天 (water agar, WA) 上に置床して培養し、伸展した菌糸を分離する手法である。WA 中には寒天以外の栄養素が存在しないため、植物組織を栄養分とすることのできる微生物のみが優先的に生育できる。このため、この手法により分離される菌類が病原菌である可能性が高い。まず、葉の病斑部と無病徴部の境界領域の組織をおよそ 5 mm 角に切除し、0.25% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液中で数分間攪拌して表面殺菌した後、直ちに 1.5% 水寒天 (1,000 ml あたり Agar 15 g) 上に置床した。

また、細菌の感染有無を判定するため、画線培養による分離を試みた。本法は、植物組織中に存在する細菌類を栄養豊富な培地上に接種してコロニーを形成させ、分離する手法である。形成されたコロニーのうち多数のコロニーを形成した細菌が病原である可能性が高い。およそ 5 mm 角の感染葉切片を 500 μ l の滅菌水中に懸濁し、懸濁液を Nutrient Agar (NA、1,000 ml あたり ラブ-レムコ寒天培地 23 g、NaCl 5 g) 平板培地上に画線した。いずれも 25°C、暗黒下に静置して培養し、経過を観察した。

2.2.3 電子顕微鏡観察

ウイルス粒子を観察するため、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。およそ 5 mm 角の感染組織片を 20 μ l の 2% phosphotungstic acid (pH 7.0) 中で磨砕し、カーボン蒸着した支持膜付きの銅製グリッド上に付着させ、余分な粗汁液をろ紙に触れさせて除き風乾後、電子顕微鏡観察に供試した。作製したグリッドの観察には、透過型電子顕微鏡 JEM-1010 (JEOL) を用いた。

2.2.4 分子生物学的診断

クリスマスローズ black death 病と強い関連があるとされている HeNNV に対する特異的プライマーを設計し、以下に記す方法により RT-PCR を用いた分子生物学的診断を行った。さらに、得られた増幅産物の塩基配列を解析した。

2.2.4.1 RNA 抽出

RT-PCR の鋳型とする全 RNA を CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 法により植物組織罹病部から抽出した。試料 0.2 g を液体窒素中で磨砕し、2 ml の 2 × CTAB Buffer (1.4 M NaCl、1% PVP-10 [polyvinyl-pyrrolidone]、2% CTAB、0.1 M Tris-HCl [pH9.5]、20 mM EDTA [pH8.0])、20 μl メルカプトエタノール (1%) に溶解し、65°C で 10 分間処理した。処理後、等量のクロロホルム/イソアミルアルコール (CIA, 24:1) を加えて十分に攪拌した。15,000 ×g、常温下で 15 分間遠心分離し、水層を回収して等量の CIA を再度加え、十分に攪拌した。15,000 ×g、常温下で 15 分間遠心分離後、水層を回収し、1/3 量の 8 M LiCl を加えて混和した。−20°C に 2 時間置いた後、18,000 ×g、4°C で遠心分離して沈殿を回収し、200 μl の DEPC 処理水に溶解した。18,000 ×g、4°C で 10 分間遠心して水層を回収し、等量の 2-プロパノールを加えて混和した。−20°C に 30 分間置いた後、15,000 ×g、4°C で 30 分間遠心した。沈殿を回収し、1 ml の 70%エタノールを加えて転倒混和した。15,000 ×g、4°C で 15 分間遠心し、沈殿を回収して、デシケーターで減圧乾燥した。乾燥後、RNase free water 適量に溶解し、分光光度計により濃度測定して RNA 濃度が 500 ng/μl になるように調製した。

2.2.4.2 RT-PCR

抽出した全 RNA を鋳型として、RT-PCR 法による検出を行った。プライマーは既報の HeNNV 米国分離株の外被タンパク質 (CP) アミノ酸配列をもとに、縮重プライマー (degenerate primer) を設計した。設計したプライマーは表 2.1 に示した。

RT-PCR には SuperScript III one step RT-PCR System (Invitrogen) を使用し、添付のプロトコールに従った。forward プライマーとして degenerate-F、reverse プライマーとして degenerate-R を用い、500 ng の全 RNA を鋳型とし、2 × Reaction Mix 12.5 μl、SuperScript III RT/Platinum Taq Mix 1 μl、各プライマーを終濃度 0.2 μM になるように加え、最終容量は 25 μl とした。55°C、30 分の逆転写反応後、94°C、2 分で逆転写酵素を失活させ、続けて PCR 反応を 40 サイクル (熱変性 94°C 15 秒、アニーリング 60°C 30 秒、伸長反応 68°C 20 秒を 1 サイクルとする) 行った。反応終了後、2%アガロースゲルと 1 × TAE バッファーを用いた電気泳動法により、目的の DNA 断片が増幅されていることを確認した。分子量マーカーには 100 bp DNA ladder (TaKaRa) を用いた。

2.2.4.3 塩基配列の決定と解析

得られた増幅産物が HeNNV 由来であるか確認するため、dyedeoxyterminator 法を用いて PCR 産物のダイレクトシーケンシングを行い、塩基配列を決定した。PCR 産物 5 μl に 2 μl の

ExoSAP-IT (GE Healthcare) を加え、37°C で 15 分間静置後、80°C で 15 分間処理し、PCR 反応時の余剰なプライマーおよび dNTP を失活させた。ExoSAP-IT 処理した PCR 産物をシーケンス反応に用いた。プライマーは degenerate-F または degenerate-R を用いた。シーケンス反応は 50-250 ng の PCR 産物を鋳型とし、5×Seq buffer (Applied Biosystems) 1.5 µl、PreMix (Applied Biosystems) 1 µl、プライマー を終濃度 5 µM になるように加え、最終容量 10 µl で行った。96°C、3 分で熱変性した後、25 サイクルの反応（熱変性 96°C 15 秒、アニーリング 50°C 5 秒、伸長反応 60°C 1 分を 1 サイクルとする）を行った。シーケンス反応後の試料を純化するため、カラム Sephadex G-50 SuperFine (Applied Biosystems) を用いて精製した。ウェルにカラム担体適量と 300 µl の DDW を加え、室温で 2 時間置いてカラム担体を水和した。カラムを 910 ×g で 5 分間遠心し、カラムから過剰な水分を除去した。シーケンス反応後の試料をカラムにアプライし、910 ×g で 5 分間遠心して精製した。精製した試料は減圧乾燥機により完全に乾燥させた後、15 µl のホルムアミドに溶解しよく混和した。この溶液を 95°C で 5 分間熱処理し、直ちに氷水中で急冷させて一本鎖の状態に変性させた。変性後、PRISM 3130 DNA Sequencer (Applied Biosystems) により塩基配列の解読を行った。塩基配列の解析には DNA 解析ソフトウェア ATGC Ver. 4.2 (GENETYX) を用いた。

DNA 解析ソフトウェア GENETYX-MAC Ver. 13.1 (GENETYX) を用いて決定した塩基配列を DNA 配列をアミノ酸配列に変換した。得られたアミノ酸配列と既報の HeNNV 米国分離株の CP アミノ酸配列を DNA Data Bank of Japan (DDBJ) のサーバーにおける CLUSTAL W アルゴリズム (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) によりアラインメントを行った。

2.2.5 接種試験

2.2.5.1 クリスマスローズへの接種

検出されたウイルスが本症状の原因であることを確かめるために、接種試験を行った。感染葉 0.1 g に 0.1 M リン酸バッファー 1 ml を加え乳鉢でよく磨砕し、ウイルス感染葉粗汁液を作製した。健全クリスマスローズの新展開葉にカーボランダムを振りかけ、粗汁液を機械的に接種した。接種後 2 日間、25°C の定常温室条件下で遮光して静置したのち、日照時間 20 時間/日で植物を維持し、3 週間観察した。3 週間後、接種した葉の上位葉より CTAB 法を用いて RNA 抽出し、上述の縮重プライマーにより RT-PCR を行った。

2.2.5.2 他種植物への接種

分離されたウイルスの宿主範囲を調べるために、上述と同様の方法で、他の植物にも接種試験を行った。供試植物は、カルラウイルスが宿主とする植物よりアカザ (*Chenopodium amaranticolor*)、センニチコウ (*Gomphrena globosa*)、ササゲ (*Vigna unguiculata*) ペチ

ユニア (*Petunia hybrida*)、*Chenopodium quinoa*、*Nicotiana clevelandii*、*Nicotiana glutinosa* の 7 種とした。いずれの植物も発芽してまもない植物体の新展開葉に接種した。

2.2.6 ウイルスの全長塩基配列決定および系統解析

本研究で分離した HeNNV の分子生物学的性状を明らかにするために、ウイルスゲノムの全塩基配列を解析し、系統解析を行った。

2.2.6.1 HeNNV 全塩基配列決定のためのプライマーの設計

2009 年に報告された HeNNV 米国分離株 G5、H6 の全塩基配列 (accession No. FJI96835、FJI96836) をもとに、プライマーの設計を行った。配列は NCBI サーバーを通じて GenBank データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) より入手した。配列を DNA Data Bank of Japan (DDBJ) のサーバーにおける CLUSTALW アルゴリズム (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) によりアラインメントを行った。アラインメントデータを基に、両分離株間で保存されている配列を探索し、全塩基配列を決定するためのプライマーを設計した。設計したプライマーは表 2.1 に示した。

2.2.6.2 RT-PCR および塩基配列の決定

HeNNV 感染が確認された植物体より前述と同様の手順で全 RNA を抽出し、これを鋳型として上記のプライマーを用いて RT-PCR 反応を行った。RT-PCR 後、得られた増幅産物を PCR の際に用いたプライマーにより上述と同様の方法でダイレクトシーケンスした。5'末端配列の決定は 5'-Full Race Core Set (TaKaRa) を用いて 5RACE 法により行った。添付されたプロトコルに基づいて cDNA 合成を行い、nested PCR を含めた 2 段階の LA-PCR により得られた DNA 増幅断片を pGEM-T Easy ベクター (Promega) にクローニングした。LA-PCR に用いたプライマーは、1st PCR には HeNNV-5'RACE1 (5'-GGAAGTACAGTGTACAGCATATAA-3') を、2nd PCR には HeNNV-5'RACE2 (5'-TTTCTAAGGTTTTACACACTGGGT-3') を用いた。

2.2.6.3 塩基配列およびアミノ酸配列の解析

ダイレクトシーケンスおよび 5'RACE により得られた塩基配列を、DNA 解析ソフトウェア ATGC Ver. 4.2 (GENETYX) を用いてアセンブルし、断片配列のコンティグを作成し、HeNNV の全塩基配列を決定した。得られた全塩基配列は DNA 解析ソフトウェア GENETYX-MAC Ver. 13.1 (GENETYX) により解析を行った。また、同ソフトウェアを用いて DNA 配列をアミノ酸配列に変換し、前述と同様に解析した。アミノ酸配列のドメイン検索には、NCBI サイト内の BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) および CD-Search

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) を用いた。またアミノ酸配列の膜貫通ドメイン検索には SOSUI engine ver. 1.11 (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>) を用いた。

2.2.6.4 系統樹作成

マルチプルアラインメントには DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の CLUSTAL W (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/clustalw-j.html>) を用いて行い、アラインメントの表示には GENE DOC 2.6.002 を用いた。このアラインメントをもとに、MEGA3.1 を用いて近隣結合法 (neighbor-joining (N-J) 法) により系統樹を作成した。系統樹の枝 (root) の統計的な確かさは、元のアラインメントからブートストラップリサンプリングを 1,000 回繰り返すことで計算した。アミノ酸配列および塩基配列の相同性の計算には上述の ClustalW を用いた。系統解析に用いた他種ウイルスの配列はすべて GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) より収集した。

系統樹の作成に用いた HeNNV 分離株の名前 (accession number を並記) は以下の通りである。G5 (FJ196835)、H6 (FJ196836)、I6 (partial sequence、FJ196838)、NZ (partial sequence、GQ499837、GQ499838)。

系統樹の作成に用いたカルラウイルスの名前 (略称、accession number を並記) は以下の通りである。blueberry scorch virus (BlScV、NC_003499)、carnation latent virus (CLV、X52627)、chrysanthemum virus B (CVB、NC_009087 partial sequence)、garlic common latent virus (GarCLV partial sequence、AB004804)、hop latent virus (HpLV、NC_002552)、hop mosaic virus (HpMV、NC_010538)、ligustrum necrotic ringspot virus (LNRSV、NC_010305)、narcissus symptomless virus (NSV、NC_008552)、lily symptomless virus (LSV、NC_005138)、passiflora latent virus (PLV、NC_008292)、potato virus M (PVM、NC_001361)、potato virus S (PVS、NC_007289)、red clover vein mosaic virus (RCVMV、NC_012210)、garlic latent virus (GarLV、NC_003557)、aconitum latent virus (AcLV、NC_002795)、narcissus common latent virus (NCLV、NC_008266)、poplar mosaic virus (PopMV、NC_005343)、daphne virus S (DVS、NC_008020)、potato virus P (PVP、EU338239)、hippeastrum latent virus (HipLV、NC_011540)、phlox virus B (PhVB、NC_009991)、sweet potato chlorotic fleck virus (SPCFV、NC_006550)、choleus vein necrosis virus (CVNV、NC_009764)、butterbur mosaic virus (ButMV、NC_013527)。

NABP 以外の系統樹の作成においては、アウトグループとしてポテックスウイルス属の potato virus X (PVX、NC_001455) を用いた。NABP の系統樹の作製においては、アウトグループとしてアレキシウイルス属の garlic virus A (GarV-A、AB010300) を用いた。

表 2.1 HeNNV の検出、全長塩基配列解読に使用したプライマー

プライマー名	配列 (5' -> 3')
degenerate-F	GAYAGRTTYTTGAAGCTTAAGARTTYAA
degenerate-R	GCGTTNACYAGCATRТАATTCCA
HeNNV-5'RACE1	GGAAGTACAGTGTACAGCATATAA
HeNNV-5'RACE2	TTTCTAAGGTTTTACACACTGGGT
HeNNV-1F	GGATAAACACAACCTCGGCATAATTCCGGC
HeNNV-1R	ACCCTTTTCCTAATCCTAAGCA
HeNNV-2F	ACTGCAATGAGCCAAGTTTTTC
HeNNV-2R	TTSACAGRCCTTGATAAAGCTGA
HeNNV-3F	TCCTCGATATKAGCATAACTTT
HeNNV-3R	CCTTTGCGCACTTCTCTGKTTCTTT
HeNNV-4F	GATAAGCTTGCTGGTGAYCCYTGG
HeNNV-4R	GCTAAAMCTAAGAACTCCCATTTGC
HeNNV-5F	CACCTGCTCAAGTCKGACGTTGC
HeNNV-5R	AAAATGTTCGCCATATCCCC
HeNNV-6F	GGCTTCGAAACTGGACGACCC
HeNNV-6R	TTAAAAGCAAATTTATTTTAAACGTTCCACG
oligo (dT)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

2.2.7 HeNNV 検出 RT-LAMP プライマーの作製

RT-PCR より迅速性に優れた HeNNV 検出手法を確立するために、RT-LAMP 反応のためのプライマーを作製した。LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法は近年開発された遺伝子増幅法で、60 ~ 65°C の一定温度で特定の遺伝子配列を迅速かつ効率的に増幅する手法である (Notomi et al., 2000)。LAMP 反応は等温で進行するためサーマルサイクラーを必要とせず、ウォーターバスや家庭用の電気ポット、水筒など比較的安価な器具で行うことができる。さらに、LAMP 反応の進行によって生じるピロリン酸イオンは、反応液中のマグネシウムイオンと会合して不溶性の塩を生じるため、この白濁を観察することにより目視で増幅の有無の判別が可能であり (Mori et al., 2001)、電気泳動を必要としない。

2.2.7.1 プライマー設計

LAMP に用いるプライマー4種 (forward inner primer; FIP、reverse inner primer; RIP、

forward outer primer; FOP、reverse outer primer; ROP、以下これら 4 種をまとめてプライマーセットとする)の設計は web 上の LAMP 法プライマー設計支援ソフトウェア Primer Explorer V4 (<http://primerexplorer.jp>) を用いて行った。上記で得られた HeNNV 日本分離株全塩基配列をもとに、Primer Explorer V4 ソフトウェア上で計算されたプライマーセットの末端安定性、ダイマー形成能、Tm 値に基づきプライマーセット 2 種を設計した。これらのプライマーセットの配列を DNA 解析ソフトウェア ATGC Ver. 4.2 (GENETYX) を用い、HeNNV 日本分離株と全塩基配列の報告されている米国 G5、H6 分離株の全塩基配列とアライメントした。この結果から、どの分離株ともアニールするプライマーセット 2 種を決定した。プライマーセットの配列を表 2.2 に示した。

2.2.7.2 リアルタイム RT-LAMP 反応

リアルタイム RT-LAMP 反応は Isothermal master mix (Optigene) を用いて行った。この試薬は増幅反応の基質となる dNTP、反応に必須の塩類および、二本鎖 DNA にインターカレートする蛍光物質、反応副産物を分解するピロホスファターゼ、鎖置換性 DNA 合成酵素改変体を含む。DNA の増幅をインターカレーターの蛍光強度をリアルタイムにモニタリングすることで特異的増幅産物を検出する。リアルタイム RT-LAMP の反応は、鋳型 RNA 溶液 1 μ l に Isothermal master mix 12 μ l、AMV RTase 15 U/ μ l、FIP 16 μ M、RIP 16 μ M、FOP 2 μ M、ROP 2 μ M を加え、最終容量 25 μ l で行った。増幅反応を 63°C で 30 分行った後、98°C から徐々に温度を下げて増幅産物の融点を解析し、増幅の特異性を確認した。LAMP 反応および遺伝子増幅のリアルタイム検出は Genie II (Optigene) を用いて行った。検出時間は増幅速度が最大となるまでの時間とした。結果の解析には Genie ソフトウェア (Optigene) を用いた。

2.2.7.3 ループプライマーの適用

RT-LAMP 反応では、ダンベル構造の 5'末端側に相補的な配列を持つループプライマーを用いることで DNA 合成の起点を増やし、検出時間を短縮することができる。上述の web 上ソフトウェア Primer Explorer V4 を用いてループプライマー (forward loop primer; FLP、reverse loop primer; RLP) を設計した。ループプライマーの配列を表 2.2 に示す。15 μ l Isothermal master mix、15 U/ μ l AMV RTase、16 μ M FIP、16 μ M RIP、2 μ M FOP、2 μ M ROP、鋳型 RNA 溶液 1 μ l を含み、最終容量 25 μ l とし、上述と同様の温度条件でリアルタイム RT-LAMP 反応を行い検出時間を調べた。

2.2.7.4 温度条件の検討

さらに最適な温度条件を探索するため、決定されたループプライマーを含むプライマーセットを用いて 60 ~ 67°C まで 1°C ずつ温度を変えてリアルタイム RT-LAMP 反応を行い検出時間

を調べることにより、最も短時間で検出される温度を決定した。

2.2.7.5 簡易サンプル RNA 抽出法の検討

植物組織をつまようじで3回突き刺し、つまようじの先に付着した汁液を直接 RT-LAMP 反応のテンプレートとできるかを検討した。汁液の付着したつまようじの先端部を RT-LAMP 反応液に直接浸漬し、リアルタイム RT-LAMP 反応を行った。プライマーや温度条件は、上記の実験で最も検出時間の短かったものを適用した。

表2.2 HeNNV検出のためのRT-LAMPプライマー

プライマーセット #	プライマー名	配列 (5' → 3')
1	FIP	GACACAAGTGACACCATTACAATTTAACAGATGTTGGCGTTGTT
	RIP	TATTGCAAGCTTTATCCTGACCGTAGTGGCAACGACTCCTC
	FOP	CGTAGAGCACGTCAAGTC
	ROP	ATTTAAACGTTCCACGACAT
	FLP	TAGCCACCTGAGACAGATGGATT
	RLP	GGCATAGAGTACTCGACACCCGCTCCA
2	FIP	GGACACAAGTGACACCATTACAATTGCGTTGTTATCGCGTCAT
	RIP	TATTGCAAGCTTTATCCTGACCGTAGTGGCAACGACTCCTC
	FOP	ACGTCAAGTCAACAGATGTT
	ROP	ATTTAAACGTTCCACGACAT
	FLP	GCCACCTGAGACAGATGGATTT
	RLP	GGCATAGAGTACTCGACACCCGCTCCA

2.3 結果

2.3.1 我が国におけるクリスマスローズ black death 症状発生の確認と helleborus net necrosis virus の検出

我が国のクリスマスローズ (*Helleborus* spp.) 生産現場において、2003 年頃より原因不明の黒変症状が問題となっていた (栄森、竹内, 2003)。本研究では東京都のクリスマスローズ生産者より本邦未記載の黒変症状についての診断依頼を受け、まず本症状の原因を調べた。

被害植物の茎葉部には葉脈に沿ってすじ状に黒変、または黒色斑点が生じており、特に展開直後の新芽・新葉で顕著であった。また、クリスマスローズの観賞部位であるがくにも同様のすじ状の黒色斑点が見られ、著しく外観を損なっていた (図 2.4、2.5)。病徴を示す新出葉は生育が悪く、症状の激しい茎葉では壊死が観察された。本症状は、欧州を中心に発生が確認されている、black death 病の症状と酷似していた (Rice and Strangman, 1993、Eastwell et al., 2004)。

依頼時の試料を用いて、本症状の原因を調べた。まず、菌類の感染有無を調べるために、組織分離を行った。病原の可能性のある菌類を分離するため、感染組織の切片を WA 上に置床した。その結果、培養後一週間以上を経ても、菌類感染を示唆する菌糸の伸展は確認されなかった。また、細菌の感染有無を調べるため、感染組織の懸濁液を NA 上で画線培養した。その結果、一週間以上の培養期間を経ても細菌類の感染を示唆するコロニー形成は確認されなかった。さらに、ウイルスの感染有無を調べるため、症状を示す組織粗汁液の電子顕微鏡観察を行った。症状を示す組織の粗汁液を、ダイレクトネガティブ染色法により染色し、検鏡した結果、長さ 600 ~ 900 nm のひも状ウイルス粒子様構造が多数観察された (図 2.6)。

2006年、米国において黒変症状を呈する black death 病に罹病したクリスマスローズに新種のカルラウイルスである helleborus net necrosis virus (HeNNV) が感染していることが報告され、黒変症状と HeNNV 感染との関係が示唆された (Eastwell et al. 2004)。診断依頼のあった本罹病株の症状が black death 病と酷似していたこと、ひも状ウイルス粒子が観察されたことから、本罹病株には我が国では未発生の HeNNV が感染していることが疑われた。

そこで、本罹病株より reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) を用いて HeNNV の検出を試みた。この時点では、HeNNV のゲノム情報については米国分離株の CP アミノ酸配列しか報告されていなかったため、このアミノ酸配列をもとに縮重プライマー (degenerate primer) を設計した。症状を示す罹病展開葉、新葉、がくからそれぞれ全 RNA を抽出し、RT-PCR を行った後、サンプルの一部を電気泳動した。その結果、予想された約 460 bp の位置に特異的な DNA 断片の増幅がいずれの組織からも検出された。一方、健全な植物体の組織からは特異的な増幅産物は検出されなかった (図 2.7)。続いて、この罹病組織特異的な増幅産物が HeNNV に由来する配列であるかを検証するため、増幅産物の塩基配列を解読した。決定された塩基配列を GENETYX-MAC Ver. 13.1 を用いてアミノ酸配列に変換し、既報の HeNNV 分離株の CP アミノ酸配列と比較したところ、CP アミノ酸部分配列で 90%以上の高い相同性を示した (図 2.8)。このことから、本罹病株において HeNNV の感染を結論した。以下、本分離株を HeNNV 日本分離株 (HeNNV-J) とする。

上記で検出された HeNNV-J が本黒変症状の原因であることを確かめるために、接種試験を行った。RT-PCR により HeNNV 感染が確認されたクリスマスローズの罹病葉を用いて粗汁液を作成し、健全クリスマスローズに機械的に接種した。しかし、3週間経過後も、接種葉、上位葉ともに病徴は再現されなかった。上位葉より全 RNA を抽出し、上述の縮重プライマーを用いて RT-PCR を行ったが、特異的な DNA 断片の増幅は検出されなかった。

クリスマスローズでは病徴が再現されなかったため、引き続き HeNNV-J の病原性を確かめると同時に宿主範囲を調べるために、同様の接種試験を他の 7 種類の植物 (アカザ [*C. amaranticolor*]、センニチコウ [*G. globosa*]、ササゲ [*V. unguiculata*]、ペチュニア [*P. hybrida*]、*C. quinoa*、*N. clevelandii*、*N. glutinosa*) に対して行った。本接種試験に用いた植物は、複数のカルラウイルスに共通した宿主植物や検定植物から選んだ。しかし、いずれの植物においてもウイルス感染を示す病徴は現れず、RT-PCR の結果も陰性であった (表 2.3)。

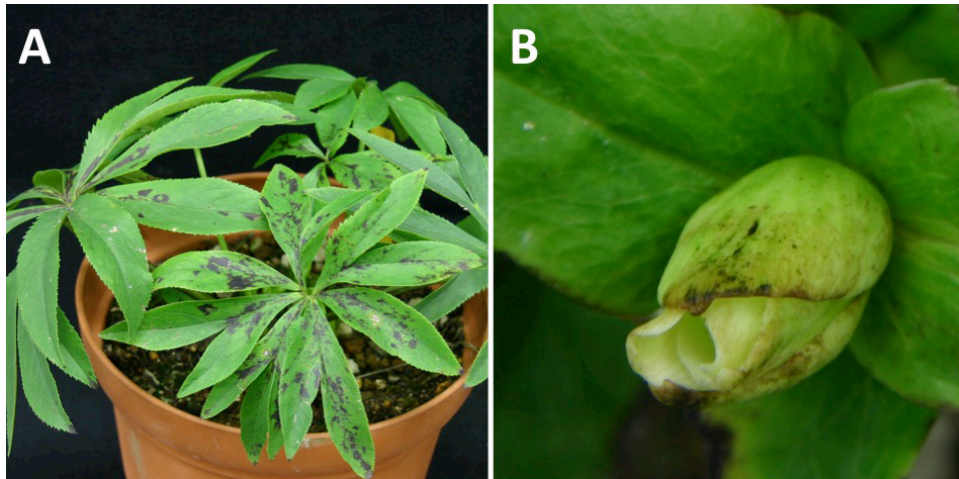


図 2.4 診断依頼のあったクリスマスローズの発生症状 1

(A) 葉脈に沿った黒変症状。

(B) がくに生じたすじ状の黒色斑点。

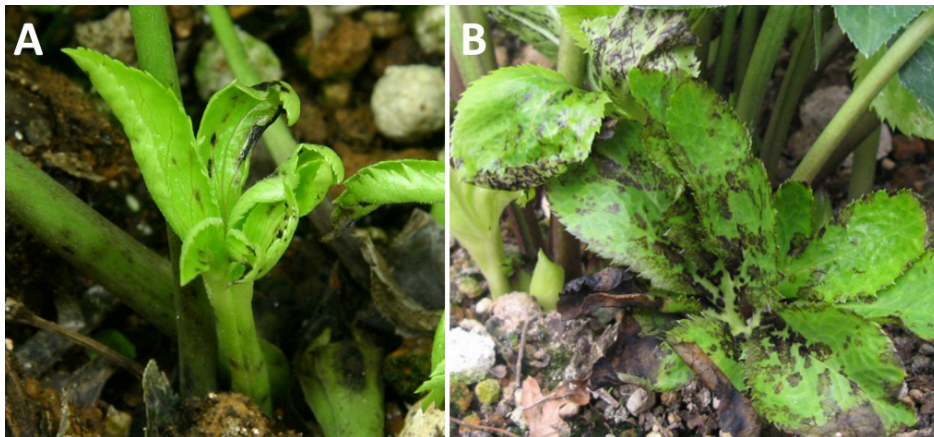


図 2.5 診断依頼のあったクリスマスローズの発生症状 2

(A) 新展開葉に生じたすじ状の黒色斑点。

(B) 新展開葉に生じた黒色斑点。

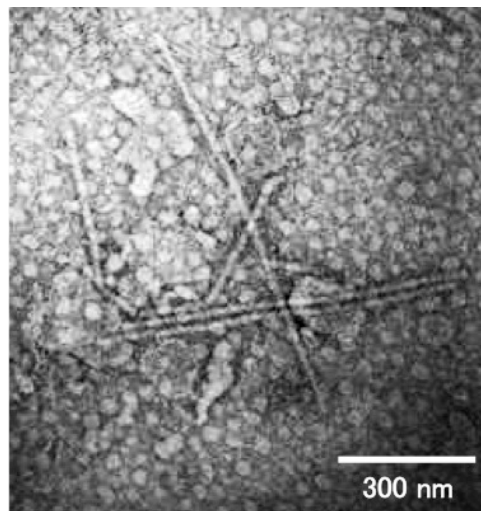


図 2.6 症状を呈するクリスマスローズ粗汁液の電子顕微鏡観察像
長さ 600-900 nm のひも状ウイルス様粒子構造が観察された。

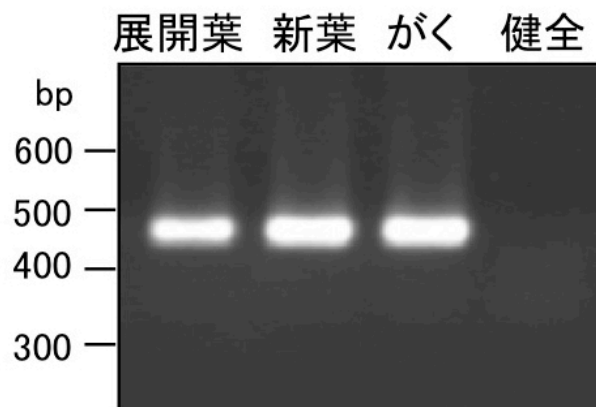


図 2.7 RT-PCR による HeNNV 感染の検定
罹病組織特異的に DNA 断片が増幅された。

```

          *           20           *           40
J  : DRFLKLKEFNLNLLTATRLVNSGFETGRPKARVAASMRGD : 40
G5 : DRFLKLKEFNLNLLTATRLVNSGFETGRPKARVAASMRGD : 40
H6 : DRFLKLKEFNLNLLTATRLVNSGFETGRPKARVAASMRGD : 40
I6 : DRFLKLKEFNLNLLTATRLVNSGFETGRPKARVAASMRGD : 40

          *           60           *           80
J  : MANIFTSPTLDTLQALPWNPVSSRLATAEELAKISAKIEA : 80
G5 : MANIFTSPTLDTLQALPWNPVSSRLATAEELAKISAKIEA : 80
H6 : MANIFTSPTLDTLQALPWNPVSSRLATAEELAKISAKIEA : 80
I6 : MANIFTSPTLDTLQALPWNPVSSRLATAEELAKISAKIEA : 80

          *           100          *           120
J  : LGFPRDQLAKLFDVSRCASNSSSPYSDPKGVIEFDGGA : 120
G5 : LGFPRDQLAKLFDVSRCASNSSSPYSDPKGVIEFDGGA : 120
H6 : LGFPRDQLAKLFDVSRCASNSSSPYSDPKGVIEFDGGA : 120
I6 : LGFPRDQLAKLFDVSRCASNSSSPYSDPKGVIEFDGGA : 120

          *           140          *
J  : ITRDAALAVIRDISSLRRVCRSYSKIVWNYMLVN : 154
G5 : ITRDAALAVIRDISSLRRVCRSYSKIVWNYMLVN : 154
H6 : ITRDAALAVIRDISSLRRVCRSYSKIVWNYMLVN : 154
I6 : ITRDAALAVIRDISSLRRVCRSYSKIVWNYMLVN : 154

```

図 2.8 HeNNV 日本分離株 (J) と米国分離株 (G5、H6、I6) の CP アミノ酸部分配列の比較
アライメント図の上の数字はアミノ酸数を示す。10 アミノ酸目から 20 アミノ酸ごとに星印を付
けた。黒色背景は 4 分離株間で、灰色背景は 3 分離株間でアミノ酸が一致していることを示す。

表 2.3 接種試験に用いた植物および接種試験の結果

植物名 (学名)	病徴	RT-PCR
クリスマスローズ (<i>Helleborus</i> spp.)	-	-
アカザ (<i>Chenopodium amaranticolor</i>)	-	-
センニチコウ (<i>Gomphrena globosa</i>)	-	-
ササゲ (<i>Vigna unguiculata</i>)	-	-
ペチュニア (<i>Petunia hybrida</i>)	-	-
<i>Chenopodium quinoa</i>	-	-
<i>Nicotiana clevelandii</i>	-	-
<i>Nicotiana glutinosa</i>	-	-

2.3.2 HeNNV 日本分離株(HeNNV-J)の全長塩基配列解析および系統解析

これまでの実験で、東京都において問題となっている黒変症状を示すクリスマスローズに対し、海外において black death 病と関係があるとされている HeNNV が感染していることが示された。しかし、本ウイルスについての知見は未だ乏しく、全長塩基配列の決定されている分離株も G5、H6 の 2 分離株のみで、ゲノム上にコードされているタンパク質について他のウイルスとの詳細な比較などはも行われていない。そこで本ウイルスの分子生物学的性状を明らかにすべく以下の実験を行った。

HeNNV-J の性状を明らかにするため、全塩基配列の解読を行った。全長塩基配列の解読にあたって、米国の研究グループが 2009 年に HeNNV 米国分離株 G5、H6 について全長塩基配列を報告したため、これらの配列をもとに全長解析のためのプライマーを設計した(表 2.1)。まず、縮重プライマーを用いた RT-PCR により HeNNV 感染の確認されたクリスマスローズ植物組織より全 RNA を抽出した。この全 RNA をテンプレートとして、G5、H6 分離株の全長塩基配列を基に設計したプライマーにより RT-PCR を行い、5 つの増幅産物を得た。これらの配列に対して PCR で用いたプライマーによりダイレクトシーケンスを行い、米国分離株の 5'末端からの塩基数で 1,488 ~ 3,030 番目、2,853 ~ 4,665 番目、4,466 ~ 5,936 番目、5,879 ~ 7,542 番目、7,475 ~ 8,542 番目の領域について塩基配列を決定した。さらにゲノムの 5'末端側の塩基配列を解読するため 5'RACE 法を行い、プライマー HeNNV-1F、HeNNV-1R を用いて 5'RACE 産物のダイレクトシーケンスを行った。これら 6 つの断片配列を ATGC Ver. 4.2 によりアセンブルしたところ、5'末端から 3'末端まで全長をカバーすると考えられる単一のコンティグが得られた。

決定した塩基配列を DNA 解析ソフトウェア GENETYX-MAC Ver. 13.1 によって解析した。その結果、米国の G5、H6 分離株の記載と同様、ゲノム上には 6 つの ORF が存在すると推定され、それぞれ 5'末端側から RdRp、TGBp1、2、3、CP、NABP がコードされると考えられた。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 8,541 塩基であった。5'UTR は 1 ~ 58 番目、3'UTR は 8,482 ~ 8,541 番目であった。

HeNNV-J の全長塩基配列を米国の G5、H6 分離株と比較したところ、G5 分離株と 99%、H6 分離株と 81% の相同性を示した(図 2.9)。さらに、これらの分離株とともに、部分配列が報告されている米国の I6 分離株 (FJI96838)、ニュージーランドの NZ 分離株 (GQ499837、GQ499838) を加えて分子系統解析を行った。RdRp の部分配列 (J 株の 5'末端からの塩基数で 5,315 ~ 5,541 番目) による系統解析の結果、J 分離株と G5 分離株、H6 分離株と I6 分離株がそれぞれ同じクレードに含まれることが示された。NZ 分離株は他の分離株とは遠縁であった(図 2.10)。CP と NABP の部分配列 (J 株の 5'末端からの塩基数で 8,111 ~ 8,473 番目) を用いた系統

解析でも同様の系統関係が得られた (図 2.10)。

2.3.2.1 ORF1 の遺伝子構造解析

HeNNV G5 分離株の全長塩基配列から HeNNV ゲノム上には 6 つの ORF が存在し、他のカルラウイルスとの比較類推から 6 つの ORF はそれぞれ RdRp、TGBp1、2、3、CP、NABP がコードされていると推定されていた (Eastwell et al., 2009)。しかし、各 ORF の詳細な解析はなされていなかったため、今回分離された HeNNV-J の配列を用いて機能ドメインおよびモチーフ配列の解析をおこない、それぞれの ORF にコードされているタンパク質の機能を検証した。

59 ~ 5,929 nt に存在する ORF1 にコードされるタンパク質は推定分子量 221 kDa であった。アミノ酸配列をもとにドメイン構造を予測したところ、他のカルラウイルスの RdRp に保存されている 6 個のドメインのうち、MET ドメイン、OTU 様システインプロテアーゼ (OTU-like cysteine protease) ドメイン、C23 ファミリーシステインエンドペプチダーゼ (C23 family endopeptidase) ドメイン、POL ドメインが予測された (図 2.11)。HEL ドメインおよび AlkB ドメインについてはそれぞれの部分配列が予測された。AlkB ドメインは 2-オキシグルタル酸依存性および鉄 (II) イオン依存性オキシゲナーゼに見出されるドメインであり (Bratlie and Drablos, 2005)、鉄 (II) イオンとの相互作用に必須のアミノ酸モチーフ (H-X-D motif [745 ~ 779aa]、H [800aa]、R-X5-R motif [809 ~ 815aa]) は保存されていることから、HeNNV-J のこの領域は AlkB と同様の活性を有する可能性がある。HEL は二本鎖 RNA の塩基対、および一本鎖 RNA の分子内に形成される高次構造を解き、複製酵素による RNA 合成の進行を進める活性を有する (池上ら, 2009)。HeNNV-J では核酸結合に重要なモチーフ (GTFGSGKS [1149 ~ 1156aa]) や NTPase 活性のモチーフ (LFVVGDPQC [1257 ~ 1265aa]) (Kadaré and Haenni, 1997) が保存されており、他のカルラウイルスの HEL ドメイン領域と HeNNV の該当領域の配列の保存性が高いことから、この領域がヘリケース活性を有する可能性がある。以上のことから、ORF1 にコードされる 221 kDa のタンパク質は、RdRp をコードしていると考えられた。

他のカルラウイルスと配列一致度を調べたところ、塩基配列での一致度は 22 ~ 58% であり、アミノ酸配列での一致度は 41 ~ 47% であった。なかでも、PopMV (47%)、PhVB (46%) と高いアミノ酸配列一致度を示した。

2.3.2.2 ORF2、3、4 の遺伝子構造解析

HeNNV-J の ORF2 は 5,960 ~ 6,793 番目に、ORF3 および ORF4 はそれぞれ 6,642 ~ 6,968 番目および 6,956 ~ 7,159 番目に存在しており ORF2、3 および 3、4 は互いに重複していた。この構造は他のカルラウイルスにコードされる TGB に類似していた。ORF2 にコードされるタンパ

ク質は 234 残基からなり推定分子量 26 kDa であった。ORF2 にコードされるタンパク質は他のカルラウイルスにコードされる TGBp1 と同様に 25 ~ 226aa に HEL ドメインが予測された。(図 2.12)。以上のことから ORF2 にコードされるタンパク質は TGBp1 であると考えられた。また、他のカルラウイルスの TGBp1 と比較したところアミノ酸配列で 28 ~ 43% の一致度を示し、特に HpLV (43%)、LNRSV (42%) と高い一致度を示した。

ORF3 および 4 にそれぞれコードされるタンパク質の推定分子量は 11.5 kDa および 7.4 kDa であった。ORF3 にコードされるタンパク質には 2 つの膜貫通領域 (transmembrane domain; TMD [12 ~ 34aa および 72 ~ 93aa]) が存在し、38 ~ 50aa には保存配列が見出された (図 2.13)。ORF4 にコードされるタンパク質には 1 つの膜貫通領域 (4 ~ 26aa) が存在し、32 ~ 46aa には保存配列が見出された (図 2.14)。これらの特徴はそれぞれ他のカルラウイルスの TGBp2、3 と共通していた。以上のことから ORF3 および ORF4 にコードされるタンパク質は、それぞれ TGBp2 および TGBp3 であると考えられた。また、他のカルラウイルス属の TGBp2 とアミノ酸配列を比較したところ、34 ~ 51% の一致度を示し、特に PopMV (51%)、ButMV (47%)、PVP (47%) と高い一致度を示した。他のカルラウイルス属の TGBp3 と比較では、13 ~ 40% の一致度を示し、特に PopMV (40%)、CVNV (38%)、PhVB (38%) と高い一致度を示した。

2.3.2.3 ORF5 の遺伝子構造解析

HeNNV-J の ORF5 は 7,226 ~ 8,155 番目に存在しており、コードされるタンパク質の推定分子量は 34.8 kDa であった。他のカルラウイルスと同様に保存配列 (123 ~ 262aa) および A/GFDF モチーフ (FFDS [238 ~ 241aa]) が見出されたことから (図 2.15)、ORF5 にコードされるタンパク質は CP であると考えられた。他のカルラウイルスの CP のアミノ酸配列を比較したところ 34 ~ 48% の相同性を示し、特に GarLV (48%)、CLV (48%)、GarCLV (47%) と高い相同性を示した。

2.3.2.4 ORF6 の遺伝子構造解析

HeNNV-J の ORF6 は、8,155 ~ 8,481 番目に存在しており、コードされるタンパク質の推定分子量は 12.2 kDa であった。カルラウイルス属の ORF6 にコードされる NABP は、cystein-rich protein (CRP) とも呼ばれる。NABP は同じベータフレキシウイルス科ではヴィティウイルス属、トリコウイルス属にコードされるほか、他の科でもアレキシウイルス属、マンダリウイルス属 (Genus *Mandarivirus*)、ホルデイウイルス属 (Genus *Hordeivirus*)、フロウイルス属 (Genus *Furovirus*)、ペクルウイルス属 (Genus *Pecluvirus*)、ベニウイルス属 (Genus *Benyvirus*)、トブラウイルス属 (Genus *Tobravirus*) にも見出される。カルラウイルス属の CVB がコードする NABP は、塩基性モチーフ (basic motif) およびジンクフィンガーモチーフ

(zinc-finger motif: C-X2-C-X12-C-X4-C) を有し、核酸への結合活性、核局在性を有するほか、PVX ベクターで一過的に発現させると細胞死を誘導する (Lukhovitskaya et al., 2009)。HeNNV の ORF6 にコードされるタンパク質においても basic motif (KKRR [49 ~ 52aa]) および zinc-finger motif (C-WR-C-YRVIGGLCLPKN-C-NGVT-C [59 ~ 80aa]) が見出された (図 2.16)。ORF6 にコードされているタンパク質は、他のカルラウイルスの NABP と比較したところ、アミノ酸配列で 12 ~ 26% の相同性を示した。

以上の結果から、HeNNV-J は他のカルラウイルスと類似した遺伝子構造を有しており、5'末端から RdRp、TGBp1、2、3、CP、NABP をコードしていることが強く示唆された。

2.3.2.5 他のカルラウイルスとの系統解析

HeNNV のカルラウイルス属内における系統関係を明らかにするために、すべての ORF についてそれぞれの HeNNV-J のアミノ酸配列をもとに系統解析を行った。ClustalW よりにマルチプルアラインメントを作成した後、これをもとに MEGA3.1 を用いて分子系統樹を作成した (図 2.17)。

RdRp アミノ酸配列による系統樹では、HeNNV は PopMV と最も近縁であった。CP アミノ酸配列による系統樹では、系統関係はおおよそ RdRp 配列による系統関係と類似していたが、最も近縁のウイルスは RCVMV であった。RdRp、CP による系統樹では大きく PopMV を含むグループ (以下 A グループ) と PhVB を含むグループ (以下 B グループ) の 2 つのグループに分かれ、HeNNV は A グループに属した。

TGBp1 アミノ酸配列による系統樹でも RdRp や CP での系統樹と同様の A グループと B グループに分かれたが、HeNNV は B グループに含まれた。また、HeNNV は B グループ内で他のウイルスとクラスターを形成しなかった。TGBp2 アミノ酸配列による系統樹では HeNNV は GarLV と最も近縁であった。また TGBp2 では、RdRp と全く同様の 2 つのグループに分かれ、HeNNV は RdRp、CP での系統樹と同様 A グループに属した。一方、TGBp3 についての系統樹は他のどの ORF についての系統樹とも類似しないが、HeNNV は PopMV、CVNV と近縁であった。

NABP アミノ酸配列による系統樹は他のどの ORF についての系統樹とも類似せず、さらに顕著な特徴として系統的に独立した 3 つのグループ、すなわち PopMV が含まれるグループ、SPCFV が含まれるグループ、NSV、RCVNV、CVNV、PhVB が含まれるグループに分けられることが分かった。NABP についての系統樹では HeNNV は PopMV グループに属し、グループ内では他のウイルスとクラスターを形成しなかった。

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *      100
J : GGATAAACACAACCTCGGCATAAATTCGGCTTAATTCAAAACAATCAAGTCAATTACGTAATGGCCTCACATACAGGAGTCCCATCGAGAATGTGCTAAACA : 100
G5 : GGATAAACACAACCTCGGCATAAATTCGGCTTAATTCAAAACAATCAAGTCAATTACGTAATGGCCTCACATACAGGAGTCCCATCGAGAATGTGCTAAACA : 100
H6 : GGATAAACACAACCTCGGCATAAATTCGGCTTAATTCAAAACAATCAAGTCAATTACGTAATGGCCTCACATACAGGAGTCCCATCGAGAATGTGCTAAACA : 100

*      120     *      140     *      160     *      180     *      200
J : ACATTTACACAACCGAGCAGAGCTCCATCTCTGCTCCAGCGTTAAATGGTACAAAAGATCAGGAGCCGAGCAGCTTTGCCTTATTCAATTACGGCTCC : 200
G5 : ACATTTACACAACCGAGCAGAGCTCCATCTCTGCTCCAGCGTTAAATGGTACAAAAGATCAGGAGCCGAGCAGCTTTGCCTTATTCAATTACGGCTCC : 200
H6 : ACATTTACACAACCGAGCAGAGCTCCATCTCTGCTCCAGCGTTAAATGGTACAAAAGATCAGGAGCCGAGCAGCTTTGCCTTATTCAATTACGGCTCC : 200

*      220     *      240     *      260     *      280     *      300
J : CTGAGTTCAGCTAAACAGCGACTATGGCAAGCGGTCTCTATCTAAGTCCATTTTCCGCTACCCACAGCCACCCAGTGTGTAAAACCTTAGAATTTA : 300
G5 : CTGAGTTCAGCTAAACAGCGACTATGGCAAGCGGTCTCTATCTAAGTCCATTTTCCGCTACCCACAGCCACCCAGTGTGTAAAACCTTAGAATTTA : 300
H6 : CTGAGTTCAGCTAAACAGCGACTATGGCAAGCGGTCTCTATCTAAGTCCATTTTCCGCTACCCACAGCCACCCAGTGTGTAAAACCTTAGAATTTA : 300

*      320     *      340     *      360     *      380     *      400
J : TATGCTTACCTGTACTTCCCACTTATGTAGATAAATCTTTTATTTCTGTAGGATTAAGAATCACAAATTAGAATTTCTGAAGCAAGACGAAACAC : 400
G5 : TATGCTTACCTGTACTTCCCACTTATGTAGATAAATCTTTTATTTCTGTAGGATTAAGAATCACAAATTAGAATTTCTGAAGCAAGACGAAACAC : 400
H6 : TATGCTTACCTGTACTTCCCACTTATGTAGATAAATCTTTTATTTCTGTAGGATTAAGAATCACAAATTAGAATTTCTGAAGCAAGACGAAACAC : 400

*      420     *      440     *      460     *      480     *      500
J : GTCAACTCTGTCGAAAGCCTAAATCGTAAAGTACGAGTCTCAAAAATTCAGGTATCCAAAAGACTTTGTCTATGCTAGAGTGAAGATTTGCGGCG : 500
G5 : GTCAACTCTGTCGAAAGCCTAAATCGTAAAGTACGAGTCTCAAAAATTCAGGTATCCAAAAGACTTTGTCTATGCTAGAGTGAAGATTTGCGGCG : 500
H6 : GTCAACTCTGTCGAAAGCCTAAATCGTAAAGTACGAGTCTCAAAAATTCAGGTATCCAAAAGACTTTGTCTATGCTAGAGTGAAGATTTGCGGCG : 500

*      520     *      540     *      560     *      580     *      600
J : TCAAGAGGCATCAGAGATTCTTATCAAAATCCCTCACTCAAAAACGCTGCTCCGCGATGTCTGCAAAAATCGCAAAAGAACTTTCTCTTACAGATGAAT : 600
G5 : TCAAGAGGCATCAGAGATTCTTATCAAAATCCCTCACTCAAAAACGCTGCTCCGCGATGTCTGCAAAAATCGCAAAAGAACTTTCTCTTACAGATGAAT : 600
H6 : TCAAGAGGCATCAGAGATTCTTATCAAAATCCCTCACTCAAAAACGCTGCTCCGCGATGTCTGCAAAAATCGCAAAAGAACTTTCTCTTACAGATGAAT : 600

*      620     *      640     *      660     *      680     *      700
J : ACACTACTGGGATTAAGACAGTTTAAACGACCTTCTTGAAATCGTCAAAACGAAAGCTTGTATGCACAATGGTCTACCCCTTGAACCTTTAGTTGGT : 700
G5 : ACACTACTGGGATTAAGACAGTTTAAACGACCTTCTTGAAATCGTCAAAACGAAAGCTTGTATGCACAATGGTCTACCCCTTGAACCTTTAGTTGGT : 700
H6 : ACACTACTGGGATTAAGACAGTTTAAACGACCTTCTTGAAATCGTCAAAACGAAAGCTTGTATGCACAATGGTCTACCCCTTGAACCTTTAGTTGGT : 700

*      720     *      740     *      760     *      780     *      800
J : GCTAAAGAGAGCCTTAAATCCCTTGGTCTACATTTTGAGGTCAAGGGAATCTTCCGCTTTATCCCTGAGGAGTGAGAAGCGGAAGGATAACCCAAC : 800
G5 : GCTAAAGAGAGCCTTAAATCCCTTGGTCTACATTTTGAGGTCAAGGGAATCTTCCGCTTTATCCCTGAGGAGTGAGAAGCGGAAGGATAACCCAAC : 800
H6 : GCTAAAGAGAGCCTTAAATCCCTTGGTCTACATTTTGAGGTCAAGGGAATCTTCCGCTTTATCCCTGAGGAGTGAGAAGCGGAAGGATAACCCAAC : 800

*      820     *      840     *      860     *      880     *      900
J : CACTGCGAGCGGTAATCTATGAAAGCAAAATTCGATTGCTCTTCCGATGGAACAACCTATGGGGTTCAGCTTTATGAGCAAGTTTGGCAGCATTT : 900
G5 : CACTGCGAGCGGTAATCTATGAAAGCAAAATTCGATTGCTCTTCCGATGGAACAACCTATGGGGTTCAGCTTTATGAGCAAGTTTGGCAGCATTT : 900
H6 : CACTGCGAGCGGTAATCTATGAAAGCAAAATTCGATTGCTCTTCCGATGGAACAACCTATGGGGTTCAGCTTTATGAGCAAGTTTGGCAGCATTT : 900

*      920     *      940     *      960     *      980     *      1000
J : GATTTGGCTTTTCAAGAGTGAAGTCAAAATTTCCGTGGACCGCCCTTTGGAGATTTTGAATGCTGTAGCGGCAGGAGTAAAGAAAGATTTGCGGAGG : 1000
G5 : GATTTGGCTTTTCAAGAGTGAAGTCAAAATTTCCGTGGACCGCCCTTTGGAGATTTTGAATGCTGTAGCGGCAGGAGTAAAGAAAGATTTGCGGAGG : 1000
H6 : GATTTGGCTTTTCAAGAGTGAAGTCAAAATTTCCGTGGACCGCCCTTTGGAGATTTTGAATGCTGTAGCGGCAGGAGTAAAGAAAGATTTGCGGAGG : 1000

*      1020    *      1040    *      1060    *      1080    *      1100
J : GTGCAAGGTGCAATACCTTACCGGACAAATTTCCAGATTTATAGGATTTTGGCAGCGTAAACAAGCCGAAACCCAATCGATGGCAAAAT : 1100
G5 : GTGCAAGGTGCAATACCTTACCGGACAAATTTCCAGATTTATAGGATTTTGGCAGCGTAAACAAGCCGAAACCCAATCGATGGCAAAAT : 1100
H6 : GTGCAAGGTGCAATACCTTACCGGACAAATTTCCAGATTTATAGGATTTTGGCAGCGTAAACAAGCCGAAACCCAATCGATGGCAAAAT : 1100

*      1120    *      1140    *      1160    *      1180    *      1200
J : TTAGTCACTACTCCTGAACCAAGTGGTATGAGATCAAAATTTCTGAGGACTTTCAGCAAGCTGTCTATCAACACCTCTGTGACCGAAACAATGTTTAC : 1200
G5 : TTAGTCACTACTCCTGAACCAAGTGGTATGAGATCAAAATTTCTGAGGACTTTCAGCAAGCTGTCTATCAACACCTCTGTGACCGAAACAATGTTTAC : 1200
H6 : TTAGTCACTACTCCTGAACCAAGTGGTATGAGATCAAAATTTCTGAGGACTTTCAGCAAGCTGTCTATCAACACCTCTGTGACCGAAACAATGTTTAC : 1200

*      1220    *      1240    *      1260    *      1280    *      1300
J : GAACAACTACTCTGAGGCAATGTACAAAGTCTTATTCGAAGTGTCCGCCAATTTCTGGAAAGTACTTCAGTAAATTTGCGCCCTTACCTTGATAAA : 1300
G5 : GAACAACTACTCTGAGGCAATGTACAAAGTCTTATTCGAAGTGTCCGCCAATTTCTGGAAAGTACTTCAGTAAATTTGCGCCCTTACCTTGATAAA : 1300
H6 : GAACAACTACTCTGAGGCAATGTACAAAGTCTTATTCGAAGTGTCCGCCAATTTCTGGAAAGTACTTCAGTAAATTTGCGCCCTTACCTTGATAAA : 1300

*      1320    *      1340    *      1360    *      1380    *      1400
J : TTCATTGAGGAGTTAAACCTTTAACTTTCAATTTCAAACCTCAGGAGTAAAGAGCACAAGTAATGGCAACATCGATTAATTTGACTTTGCGGCGGAGAC : 1400
G5 : TTCATTGAGGAGTTAAACCTTTAACTTTCAATTTCAAACCTCAGGAGTAAAGAGCACAAGTAATGGCAACATCGATTAATTTGACTTTGCGGCGGAGAC : 1400
H6 : TTCATTGAGGAGTTAAACCTTTAACTTTCAATTTCAAACCTCAGGAGTAAAGAGCACAAGTAATGGCAACATCGATTAATTTGACTTTGCGGCGGAGAC : 1400

*      1420    *      1440    *      1460    *      1480    *      1500
J : TGGAGCCACAGACGGTTTTCAGACTACTGATGACGGTTTCAAAGCTCTAGAATGTTTATGGTGAGCGCCACAGGACCGCTTTATTACTGCAATGAGCC : 1500
G5 : TGGAGCCACAGACGGTTTTCAGACTACTGATGACGGTTTCAAAGCTCTAGAATGTTTATGGTGAGCGCCACAGGACCGCTTTATTACTGCAATGAGCC : 1500
H6 : TGGAGCCACAGACGGTTTTCAGACTACTGATGACGGTTTCAAAGCTCTAGAATGTTTATGGTGAGCGCGAAGATTCGCTTACCACATGCAATGAGCC : 1500

```

```

*      1520      *      1540      *      1560      *      1580      *      1600
J : AAGTTTTTCATGTTTCGATTTTGTAGTATTCGTTT TAGAGCGGACCCCTTACCCTTATTTTGTAAACGCATGGAAGTGAATCCCAAGTAAGATTAGT : 1600
G5 : AAGTTTTTCATGTTTCGATTTTGTAGTATTCGTTT TAGAGCGGACCCCTTACCCTTATTTTGTAAACGCATGGAAGTGAATCCCAAGTAAGATTAGT : 1600
H6 : AAGTTTTTCGTTTTCGATTTTGTAGTATTCGTTT TAGAGCGGACCCCTTACCCTTATTTTGTAAACGCATGGAAGTGAATCCCAAGTAAGATTAGT : 1600

*      1620      *      1640      *      1660      *      1680      *      1700
J : CTGGGGCGTTAAACCAATTTTCGTTCGCATTCTTCGGAAATGCTCTACTAACGCACAAGCTGCTGGGGTCTACACTGAAATGCTGCTTAGGATTA : 1700
G5 : CTGGGGCGTTAAACCAATTTTCGTTCGCATTCTTCGGAAATGCTCTACTAACGCACAAGCTGCTGGGGTCTACACTGAAATGCTGCTTAGGATTA : 1700
H6 : CTGGGGCGCCGCGCAATTTTCGTTCGCATTCTTCGGAAATGCTCTACTAACGCACAAGCTGCTGGGGTCTAACACTGAAATGCTGCTTAGGATTA : 1700

*      1720      *      1740      *      1760      *      1780      *      1800
J : GGAAAAGGTCGAAAGCATCCTTGTAGATTTTACAAATTTAGCTTCTTTTGTAGAACCTTCCGCTGCTGGTTGCGAAACAAAACGGAGCGCAATGTGCG : 1800
G5 : GGAAAAGGTCGAAAGCATCCTTGTAGATTTTACAAATTTAGCTTCTTTTGTAGAACCTTCCGCTGCTGGTTGCGAAACAAAACGGAGCGCAATGTGCG : 1800
H6 : GGAAAAGGTTGAGCAATCCTTGTAGATTTTACAAATTTAGTCTTTTGTAGAGCCCTCTGCTGGTTGCTGAGGGGAATCGAAGACGAATGTGCG : 1800

*      1820      *      1840      *      1860      *      1880      *      1900
J : CTATCTAAACGCAACCGATGAAATCCCCACAGTCTTCTCTCCGTAATGATCTCTACAAAAGCTGCATCGGGGAATCTATTTTCAAACCCCAAGCGAGA : 1900
G5 : CTATCTAAACGCAACCGATGAAATCCCCACAGTCTTCTCTCCGTAATGATCTCTACAAAAGCTGCATCGGGGAATCTATTTTCAAACCCCAAGCGAGA : 1900
H6 : CTATCTAAACGCAACCGATGAAATCCCCACAGTCTTCTCTCCGTAATGATCTCTACAAAAGCTGCATCGGGGAATCTATTTTCAAACCCCAAGCGAGA : 1900

*      1920      *      1940      *      1960      *      1980      *      2000
J : ACCCCGCTGAAATCCCAATTCGCGCGTTTAAAGAAAGCCACACTGAGGCTTACTATGCTCGAAATGAGCCCTGATCTGATAGCGATGAGGGCGTGG : 2000
G5 : ACCCCGCTGAAATCCCAATTCGCGCGTTTAAAGAAAGCCACACTGAGGCTTACTATGCTCGAAATGAGCCCTGATCTGATAGCGATGAGGGCGTGG : 2000
H6 : ACCCAATGGAATCCCAAGCGCTGCTCAAGAAAGAACTCGCCCTGAGCCCTGATGCTCGAAATGAGCCCTGATCTGAGGATGATGAGCGATGCTGA : 2000

*      2020      *      2040      *      2060      *      2080      *      2100
J : CTTCCTGAAACTATCCAAAGTTTCACTTGTAAAGTGTGGTTGCAATTTGCCCTTTTAAAGCTATTGGAGCTGATTTGTGATCTACCTACGCGCTGA : 2100
G5 : CTTCCTGAAACTATCCAAAGTTTCACTTGTAAAGTGTGGTTGCAATTTGCCCTTTTAAAGCTATTGGAGCTGATTTGTGATCTACCTACGCGCTGA : 2100
H6 : TTCTTCCAAAGATTTCCCAAGTTCACCTGCAAGTGTGGACTATCTTACCTTCTCTGATTTCTAGGTGCTGATCTGTGTATCTCTCCGACCCCGA : 2100

*      2120      *      2140      *      2160      *      2180      *      2200
J : TAAACTAAAAGGTCGCACTGCAAGTTGGTACTCAAAGATGGAAGGCCATACTCATACAAATGGTGGGGCTCACAAATCTCTTGGATGGCCGATCTGGCTT : 2200
G5 : TAAACTAAAAGGTCGCACTGCAAGTTGGTACTCAAAGATGGAAGGCCATACTCATACAAATGGTGGGGCTCACAAATCTCTTGGATGGCCGATCTGGCTT : 2200
H6 : TAAATTAAGGGGCGCAATGCTGGTTGGTACTCAAAGATGGAAGGCCATACTCTTACAAAGGTTGAGGCGCACAAATGCTCTGGTGGCCGATTTGGCTT : 2200

*      2220      *      2240      *      2260      *      2280      *      2300
J : GAAACATTTTGGAAATTAATGCTCACCGGTAAAGGTCCTTTGATTCGGTACTAGTGCAGGAGTATTCGAATGATTCCTGGCATGGTACCACCGCAGATA : 2300
G5 : GAAACATTTTGGAAATTAATGCTCACCGGTAAAGGTCCTTTGATTCGGTACTAGTGCAGGAGTATTCGAATGATTCCTGGCATGGTACCACCGCAGATA : 2300
H6 : GACACATTTTGGAAATTAATGCTCACCGGTAAAGGTCCTTTGATTCGGTACTAGTGCAGGAGTATTCGAATGATTCCTGGCATGGTACCACCGCTGATA : 2300

*      2320      *      2340      *      2360      *      2380      *      2400
J : ACGAGCAGATTTTAAACCCGGAGGTCGATCCTACTATGCTATCCGGTAGCGCTTCCCTCGGTTGAAATGCTCCGCTGGCGAGTGGGTTTGA : 2400
G5 : ACGAGCAGATTTTAAACCCGGAGGTCGATCCTACTATGCTATCCGGTAGCGCTTCCCTCGGTTGAAATGCTCCGCTGGCGAGTGGGTTTGA : 2400
H6 : ACGAAGAAATTTTAAACCCGGATGGCAGATTTTACTATGCTATACCTGGAGTCCCTCTCGGTTGAAATGCTCCGCAAGGTGAGTGTGGCTTGA : 2400

*      2420      *      2440      *      2460      *      2480      *      2500
J : GCACCTTGATGCACCTCTTTCGTTATGCCAGCGGTTGCAACAACAGCCACAACATCGGGTTTCGGAACATAAGGCAATCGGATATCCCTTACATTT : 2500
G5 : GCACCTTGATGCACCTCTTTCGTTATGCCAGCGGTTGCAACAACAGCCACAACATCGGGTTTCGGAACATAAGGCAATCGGATATCCCTTACATTT : 2500
H6 : ACACCTTGATGCACCTCTTTCGTTATGCCAGCGGCTTGCAACAACAGCCACAACATCGAGTTCGGAACATAAGGCAATCGGATATTCCTTACATTT : 2500

*      2520      *      2540      *      2560      *      2580      *      2600
J : CGATGTTTAGGGAATGAGCTTACCTGAGTCTGAGGAGTGAACAATGGTTTGGTCTTGACCAAGACGAAAGATGCAAGCAACTTCACTGAGTCTTT : 2600
G5 : CGATGTTTAGGGAATGAGCTTACCTGAGTCTGAGGAGTGAACAATGGTTTGGTCTTGACCAAGACGAAAGATGCAAGCAACTTCACTGAGTCTTT : 2600
H6 : CGATGTTTAGGGAATGAGCTTACCTGAGTCTGAGGAGTGAACAATGGCTTGGTCTTGACCAAGACTCTGAGGAAAGATGCAACTTCACTGAGGATTT : 2600

*      2620      *      2640      *      2660      *      2680      *      2700
J : CTGAAACITTTGGGGTAAACTCGATTCGCAAGACCAACCAATGAAAGCTTTCAAAGCCATGAAAGTCCCGCTGACGGATTTCTTTGGCATGC : 2700
G5 : CTGAAACITTTGGGGTAAACTCGATTCGCAAGACCAACCAATGAAAGCTTTCAAAGCCATGAAAGTCCCGCTGACGGATTTCTTTGGCATGC : 2700
H6 : CAGAGACATTTGGGGTAAAGCTTGAATGCAAGAGACTCACCCATGAGCCCTTCAAAACCAATCGAGTCTCTGCTGATGGGATTTCTTTGGCATGC : 2700

*      2720      *      2740      *      2760      *      2780      *      2800
J : TGTGGCTACCTTATAGGCTTAAATGGCAGTGAAGTGAAGAAAGCTGTAGCTGAGAGATCCAAAGTGAAGTAAAGCTAATGCAAGGCTCACTGGCCAA : 2800
G5 : TGTGGCTACCTTATAGGCTTAAATGGCAGTGAAGTGAAGAAAGCTGTAGCTGAGAGATCCAAAGTGAAGTAAAGCTAATGCAAGGCTCACTGGCCAA : 2800
H6 : CGTGGCTACCTTATAGGCTTAAATGGCTGCAAGTGAAGAAAGCTGTGCAAGAGACCGCTTAAAGTGAAGTAAAGCTCAATGCAAGGCTCACTAAAGCAA : 2800

*      2820      *      2840      *      2860      *      2880      *      2900
J : ATGGGGAAAGAGGTTTTCGCTGAAATGAAGCCTTTGCGGCAAGCTGAGTCTCTCGATATGAGCATAACTTTTATAATAGTGAAGAGGGCAGAGTG : 2900
G5 : ATGGGGAAAGAGGTTTTCGCTGAAATGAAGCCTTTGCGGCAAGCTGAGTCTCTCGATATGAGCATAACTTTTATAATAGTGAAGAGGGCAGAGTG : 2900
H6 : TTGGGGAAAGAACTTTTCGCAAGAAATGAGCCTTTGCAAGCCTGCTGATCTCTCGATATGAGCATAACTTTTATAATAGTGAAGAGGGCAGAGTG : 2900

*      2920      *      2940      *      2960      *      2980      *      3000
J : TCATCTTCAACAAAGAGGATCCACTCTAATGCTCTACATCAAAATCCAGATAACTCACTGCAGTCCAATTTTGCCTAGGAATGACTGTGTGATCTCGC : 3000
G5 : TCATCTTCAACAAAGAGGATCCACTCTAATGCTCTACATCAAAATCCAGATAACTCACTGCAGTCCAATTTTGCCTAGGAATGACTGTGTGATCTCGC : 3000
H6 : TCATCTTTCAACAAAGAGGATCCACTCTAATGCTCTACATCAAAATCCAGATAACTCACTGCAGTCCAATTTTGCCTAGGAATGACTGTGTGATCTCGC : 3000

```

J : AGGTCGATCAGCTTTATCAAGGCTGTCAAAGGCTCTCAAAGTGCCTAATGCGGCGGAGGACCTCTTAATTTCAAAACAGCTCTGCCGTGGGGAAGGT : 3100
G5 : AGGTCGATCAGCTTTATCAAGGCTGTCAAAGGCTCTCAAAGTGCCTAATGCGGCGGAGGACCTCTTAATTTCAAAACAGCTCTGCCGTGGGGAAGGT : 3100
H6 : TGGCGCTCAGCTTTATCAAGGCTGTCAAAGGCTCTCAAAGTGCCTAATGCGGCGGAGGACCTCTTAATTTCAAAACAGCTCTGCCGTGGGGAAGGT : 3100

J : CTGAGTTTGATGCTTCTTGGGCAGTTTCTCCATCTTGATATTCACGGCTAATTAATTAATTTGAAGGGAACACATGGAGGTAAAGAAAGGGAGTT : 3200
G5 : CTGAGTTTGATGCTTCTTGGGCAGTTTCTCCATCTTGATATTCACGGCTAATTAATTAATTTGAAGGGAACACATGGAGGTAAAGAAAGGGAGTT : 3200
H6 : CTGAGTTTGATGCTTCTTGGGCAGTTTCTCCATCTTGATATTCACGGCTAATTAATTAATTTGAAGGGAACACATGGAGGTAAAGAAAGGGAGTT : 3200

J : TTAAGCGCTGCTTACAGTTGAGCAGGAGCATATTCACACAAATGTCAAATGGGCTGCAGTGCATCCACCACATGACTGGTAGCAACAATCTGT : 3300
G5 : TTAAGCGCTGCTTACAGTTGAGCAGGAGCATATTCACACAAATGTCAAATGGGCTGCAGTGCATCCACCACATGACTGGTAGCAACAATCTGT : 3300
H6 : TGAAGAGGCTGCTTACAGTTGAGCAGGAGCATATTCACACAAATGTCAAATGGGCTGCAGTGCATCCACCACATGACTGGTAGCAACAATCTGT : 3300

J : AAGCTTCAAAAAGCTTCAAGCTTCTCAAAGCTGCGGGACGAGITGGGTACACTGTGAGGAAGAGCGAGCCGTCGATTAGCCGATAGTTTACAAGT : 3400
G5 : AAGCTTCAAAAAGCTTCAAGCTTCTCAAAGCTGCGGGACGAGITGGGTACACTGTGAGGAAGAGCGAGCCGTCGATTAGCCGATAGTTTACAAGT : 3400
H6 : GAGCTTCAAAAAGCTTCAAGCTTCTCAAAGCTGCGGGACGAGITAAATACATCCGTTGAGAAGAGAGAGCTCCCTTTAGGAGCCGCTACATAGC : 3400

J : GGAACCACGGGAGCGTGTCTCTCAAGGACCCAAATCTCTTGCAAGGGCTTAATCCGATGGGAAGCGAGGAAGTGTGGCCATAC : 3500
G5 : GGAACCACGGGAGCGTGTCTCTCAAGGACCCAAATCTCTTGCAAGGGCTTAATCCGATGGGAAGCGAGGAAGTGTGGCCATAC : 3500
H6 : GGAACCACGGGAGCGTGTCTCTCAAGGACCCAAATCTCTTGCAAGGGCTTAATCCGATGGGAAGCGAGGAAGTGTGGCCATAC : 3500

J : TGGGACATTTGGCTCTGGGAAAAGCACCTTATTCAGGATTTTCAAGGAAATCCGGAAAGCTAATATGCTTTGTTTCCCAAGAAGAAGTCTGGC : 3600
G5 : TGGGACATTTGGCTCTGGGAAAAGCACCTTATTCAGGATTTTCAAGGAAATCCGGAAAGCTAATATGCTTTGTTTCCCAAGAAGAAGTCTGGC : 3600
H6 : TGGGACATTTGGCTCTGGGAAAAGCACCTTATTCAGGATTTTCAAGGAAATCCGGAAAGCTAATATGCTTTGTTTCCCAAGAAGAAGTCTGGC : 3600

J : GCAGGAAATCAAGAGAGCTGTGTTGGAAAGTGCACCTCACCCGATGGTAAATTCAAAATTTGTGAGAAATAAGAAAAGTCAACTTCAATGCTGCAC : 3700
G5 : GCAGGAAATCAAGAGAGCTGTGTTGGAAAGTGCACCTCACCCGATGGTAAATTCAAAATTTGTGAGAAATAAGAAAAGTCAACTTCAATGCTGCAC : 3700
H6 : GCAGGAAATCAAGAGAGCTGTGTTGGAAAGTGCACCTCACAGAGATGGTAAATTCAAAATTTGTGAGAAATAAGAAAAGTCAACTTCAATGCTGCAC : 3700

J : TTTGAGACATTTCTCAAAATGGCAAAAGGTTTCAAAGCGGGGCACACCTAGTCTGGAGAAATTCATTTGTACCCACCTGGTATTATTGGAATCTGTTG : 3800
G5 : TTTGAGACATTTCTCAAAATGGCAAAAGGTTTCAAAGCGGGGCACACCTAGTCTGGAGAAATTCATTTGTACCCACCTGGTATTATTGGAATCTGTTG : 3800
H6 : TTTGAGACATTTCTCAAAATGGCAAAAGGTTTCAAAGCGGGGCACACCTAGTCTGGAGAAATTCATTTGTACCCACCTGGTATTATTGGAATCTGTTG : 3800

J : CTTGTTTGTCCAGGAGTTGACACCTTTTGTCTGTTGGGATCCCTGTCAGTAATTAATGAGTGAAGGTGACCGCAGATTTCTTCCAGGGGCCG : 3900
G5 : CTTGTTTGTCCAGGAGTTGACACCTTTTGTCTGTTGGGATCCCTGTCAGTAATTAATGAGTGAAGGTGACCGCAGATTTCTTCCAGGGGCCG : 3900
H6 : CTTGTTTGTCCAGGAGTTGACACCTTTTGTCTGTTGGGATCCCTGTCAGTAATTAATGAGTGAAGGTGACCGCAGATTTCTTCCAGGGGCCG : 3900

J : AAGTGACATTCACAAAATGCTTGTCTAAGCAAAAGTACAATTCGTTACTAGAACTCGGAGGTTTTCACAAAACCTTTTCCGGGAGGCTGCCATGCGCT : 4000
G5 : AAGTGACATTCACAAAATGCTTGTCTAAGCAAAAGTACAATTCGTTACTAGAACTCGGAGGTTTTCACAAAACCTTTTCCGGGAGGCTGCCATGCGCT : 4000
H6 : GAGCGACATTCACAAAATGCTTGTCTAAGCAAAAGTACAATTCGTTACTAGAACTCGGAGGTTTTCACAAAACCTTTTCCGGGAGGCTGCCATGCGCT : 4000

J : ATGGATGAAACAAAATGACCTGTATCAGAAAGATCTTTCATGCGCCGAGCTTTGAGAGAGTCCGAGCTTTAGCAAGGTTTTACGAAGTTTCTCTAG : 4100
G5 : ATGGATGAAACAAAATGACCTGTATCAGAAAGATCTTTCATGCGCCGAGCTTTGAGAGAGTCCGAGCTTTAGCAAGGTTTTACGAAGTTTCTCTAG : 4100
H6 : ATGGATGAAACAAAATGACCTGTATCAGAAAGATCTTTCATGCGCCGAGCTTTGAGAGAGTCCGAGCTTTAGCAAGGTTTTACGAAGTTTCTCTAG : 4100

J : TGCCTGGTTTTGACGAGAAGAAGATCATCAAGCCCAATTCGCCAAATGCGAAATATCTTACATTTGGGGATCCACTGGTAGAACTTTTGAATACGG : 4200
G5 : TGCCTGGTTTTGACGAGAAGAAGATCATCAAGCCCAATTCGCCAAATGCGAAATATCTTACATTTGGGGATCCACTGGTAGAACTTTTGAATACGG : 4200
H6 : TGCCTGGTTTTGACGAGAAGAAGATCATCAAGCCCAATTCGCCAAATGCGAAATATCTTACATTTGGGGATCCACTGGTAGAACTTTTGAATACGG : 4200

J : CTCATTCTGATCAGCAAAAGTGGCTTAGCGTGTGCGAGCAAGATGGATAACTGCACCTCCGATTTCTAGAAAATTTGCTCTTTTAAATTTGACC : 4300
G5 : CTCATTCTGATCAGCAAAAGTGGCTTAGCGTGTGCGAGCAAGATGGATAACTGCACCTCCGATTTCTAGAAAATTTGCTCTTTTAAATTTGACC : 4300
H6 : TTTTATTCTGATCAGCAAAAGTGGCTTAGCGTGTGCGAGCAAGATGGATAACTGCACCTCCGATTTCTAGAAAATTTGCTCTTTTAAATTTGACC : 4300

J : GAGGCAGCTTCGAGGCAATTCGAGAAATGGATGATCGGACTTGGCAATTTTCACACAGAGGCTTCATGATGACTTCCGAAATATTTGC : 4400
G5 : GAGGCAGCTTCGAGGCAATTCGAGAAATGGATGATCGGACTTGGCAATTTTCACACAGAGGCTTCATGATGACTTCCGAAATATTTGC : 4400
H6 : GAGGCAGCTTCGAGGCAATTCGAGAAATGGATGATCGGACTTGGCAATTTTCACACAGAGGCTTCATGATGACTTCCGAAATATTTGC : 4400

J : CCGGGAAACCACATTTTCCGATTTACTATGACCAAGCTTGGCAAGAACACCTGCTTGAAGAGGATAAGCTTGTCTGGTATCCCTGGTTGAAAACAT : 4500
G5 : CCGGGAAACCACATTTTCCGATTTACTATGACCAAGCTTGGCAAGAACACCTGCTTGAAGAGGATAAGCTTGTCTGGTATCCCTGGTTGAAAACAT : 4500
H6 : CCGGGAAACCACATTTTCCGATTTACTATGACCAAGCTTGGCAAGAACACCTGCTTGAAGAGGATAAGCTTGTCTGGTATCCCTGGTTGAAAACAT : 4500

J : GGTTCCTCGGCCAAGAAGAGGATGTTGAAAAGTCAGAGATTGAAGAAGCCATATTGGCTGAACCATGGTTCAAAACTCACCTCCCCCTCTGAGATG : 4600
G5 : GGTTCCTCGGCCAAGAAGAGGATGTTGAAAAGTCAGAGATTGAAGAAGCCATATTGGCTGAACCATGGTTCAAAACTCACCTCCCCCTCTGAGATG : 4600
H6 : GGTTCCTCGGCCAAGAAGAGGATGTTGAAAAGTCAGAGATTGAAGAAGCCATATTGGCTGAACCATGGTTCAAAACTCACCTCCCCCTCTGAGATG : 4600

J : GAAAGTGTCCGAGCTCCTTGGGTCAAAAATTTAAAAGCAAAGAAACACAGAGAAGTCCGCAAAGGTTATCTGTGAGCGATCAATTTACAGATGAGCACT : 4700
G5 : GAAAGTGTCCGAGCTCCTTGGGTCAAAAATTTAAAAGCAAAGAAACACAGAGAAGTCCGCAAAGGTTATCTGTGAGCGATCAATTTACAGATGAGCACT : 4700
H6 : GAAAGTGTCCGAGCTCCTTGGGTCAAAAATTTAAAAGCAAAGAAACACAGAGAAGTCCGCAAAGGTTATCTGTGAGCGATCAATTTACAGATGAGCACT : 4700

J : CAAAATAGGGGAAAATCTCACAAATGCCGTGAGCGCTTTGAAGCCATTACCCAAGGCACAAAACAGCGATACGTACTTTTCTATGGCCGT : 4800
G5 : CAAAATAGGGGAAAATCTCACAAATGCCGTGAGCGCTTTGAAGCCATTACCCAAGGCACAAAACAGCGATACGTACTTTTCTATGGCCGT : 4800
H6 : CAAAATAGGGGAAAATCTCACAAATGCCGTGAGCGCTTTGAAGCCATTACCCAAGGCACAAAACAGCGATACGTACTTTTCTATGGCCGT : 4800

J : GAAGAACCGCTTAAGTTTTCAAAACCTATCGGTGAGTCCGCAAGCTAAATGAGGCTAGAGGCTAGGAAAGTAACTACTTGCACAAATTTCTTCAAAAT : 4900
G5 : GAAGAACCGCTTAAGTTTTCAAAACCTATCGGTGAGTCCGCAAGCTAAATGAGGCTAGAGGCTAGGAAAGTAACTACTTGCACAAATTTCTTCAAAAT : 4900
H6 : GAAGAACCGCTTAAGTTTTCAAAACCTATCGGTGAGTCCGCAAGCTAAATGAGGCTAGAGGCTAGGAAAGTAACTACTTGCACAAATTTCTTCAAAAT : 4900

J : GTGCCGTTAAAGCCCAACAACCTCAATTTATGGCAGAGTGTGAGAGATTTGAAAGAAAAGAAACAAGAAAGAGTGCAGCAACATAGAAAACC : 5000
G5 : GTGCCGTTAAAGCCCAACAACCTCAATTTATGGCAGAGTGTGAGAGATTTGAAAGAAAAGAAACAAGAAAGAGTGCAGCAACATAGAAAACC : 5000
H6 : GTGCCGTTAAAGCCCAACAACCTCAATTTATGGCAGAGTGTGAGAGATTTGAAAGAAAAGAAACAAGAAAGAGTGCAGCAACATAGAAAACC : 5000

J : ATCTGGACGCTCTGTAGGGATTTGGCTAGCAGATCTGGGCTCATATTTATGAAGTCCAGATTTGCACAAAATTCGAAACAGATTCGGTGTGCCAAA : 5100
G5 : ATCTGGACGCTCTGTAGGGATTTGGCTAGCAGATCTGGGCTCATATTTATGAAGTCCAGATTTGCACAAAATTCGAAACAGATTCGGTGTGCCAAA : 5100
H6 : ATCTGGACGCTCTGTAGGGATTTGGCTAGCAGATCTGGGCTCATATTTATGAAGTCCAGATTTGCACAAAATTCGAAACAGATTCGGTGTGCCAAA : 5100

J : AGCTGGCAATCGATAGTTTGGCTTCCAGCAATCAGTACTGTGTCGATTTGCCCATATATGAGGTACATCGAGATGAAACTACAGGAAGCCCTGCCAAG : 5200
G5 : AGCTGGCAATCGATAGTTTGGCTTCCAGCAATCAGTACTGTGTCGATTTGCCCATATATGAGGTACATCGAGATGAAACTACAGGAAGCCCTGCCAAG : 5200
H6 : AGCTGGCAATCGATAGTTTGGCTTCCAGCAATCAGTACTGTGTCGATTTGCCCATATATGAGGTACATCGAGATGAAACTACAGGAAGCCCTGCCAAG : 5200

J : AAATTCTAATATCATAGCGGAAAGGGCTTGAAGAATTGAACAAATGGGTCTCTGGGGAAATTTCCGGGTATTTGCACCGAATCTGATATGAAGCT : 5300
G5 : AAATTCTAATATCATAGCGGAAAGGGCTTGAAGAATTGAACAAATGGGTCTCTGGGGAAATTTCCGGGTATTTGCACCGAATCTGATATGAAGCT : 5300
H6 : AAATTCTAATATCATAGCGGAAAGGGCTTGAAGAATTGAACAAATGGGTCTCTGGGGAAATTTCCGGGTATTTGCACCGAATCTGATATGAAGCT : 5300

J : TTGATGCAAGCAAGCAACCAATATGTGGCTTTTGAAGTCTGCTTGCATGGATACCTCGGAATACCAAAAGACCTCATTGCCGATATTTGCTACATCAA : 5400
G5 : TTGATGCAAGCAAGCAACCAATATGTGGCTTTTGAAGTCTGCTTGCATGGATACCTCGGAATACCAAAAGACCTCATTGCCGATATTTGCTACATCAA : 5400
H6 : TTGATGCAAGCAAGCAACCAATATGTGGCTTTTGAAGTCTGCTTGCATGGATACCTCGGAATACCAAAAGACCTCATTGCCGATATTTGCTACATCAA : 5400

J : AAGCCACTGGGCTTCCAAATTTGGGCTTTTCCAAATATGCGCTTCTCTGGGGAGGCTAGCACTTTCTTTTCAATACCATGGCAAAATGTTATTTACT : 5500
G5 : AAGCCACTGGGCTTCCAAATTTGGGCTTTTCCAAATATGCGCTTCTCTGGGGAGGCTAGCACTTTCTTTTCAATACCATGGCAAAATGTTATTTACT : 5500
H6 : AAGCCACTGGGCTTCCAAATTTGGGCTTTTCCAAATATGCGCTTCTCTGGGGAGGCTAGCACTTTCTTTTCAATACCATGGCAAAATGTTATTTACT : 5500

J : TTCTCTCGGTAAGAGTTTACGGGAAAGATTTTATTAGTTTCTGCGGGATGATATGTGGCTCTAAAGAGGTTGAGGGTAAAGCTTGAGCAAGAGAGCT : 5600
G5 : TTCTCTCGGTAAGAGTTTACGGGAAAGATTTTATTAGTTTCTGCGGGATGATATGTGGCTCTAAAGAGGTTGAGGGTAAAGCTTGAGCAAGAGAGCT : 5600
H6 : TTCTCTCGGTAAGAGTTTACGGGAAAGATTTTATTAGTTTCTGCGGGATGATATGTGGCTCTAAAGAGGTTGAGGGTAAAGCTTGAGCAAGAGAGCT : 5600

J : TTCTAGGGAAAATAAAATTGAAAGCAAACTCAACTTCACTCCAAACCAACITTTTCGGGTGGTCTTACACCAGATGGGATTTTAAACAAACCCA : 5700
G5 : TTCTAGGGAAAATAAAATTGAAAGCAAACTCAACTTCACTCCAAACCAACITTTTCGGGTGGTCTTACACCAGATGGGATTTTAAACAAACCCA : 5700
H6 : TTCTAGGGAAAATAAAATTGAAAGCAAACTCAACTTCACTCCAAACCAACITTTTCGGGTGGTCTTACACCAGATGGGATTTTAAACAAACCCA : 5700

J : ACTAGTTTTTCGAGAGGCTGTGCATAGCTAAAGAAACCAATAAACCCTGGCTAATTCATTTGATAAATACGCAATGAGATTTTCCATGCTTACAAACTTGGG : 5800
G5 : ACTAGTTTTTCGAGAGGCTGTGCATAGCTAAAGAAACCAATAAACCCTGGCTAATTCATTTGATAAATACGCAATGAGATTTTCCATGCTTACAAACTTGGG : 5800
H6 : ACTAGTTTTTCGAGAGGCTGTGCATAGCTAAAGAAACCAATAAACCCTGGCTAATTCATTTGATAAATACGCAATGAGATTTTCCATGCTTACAAACTTGGG : 5800

J : GAAGCCGCAAGTTAGGCATGAGCAATTGAGGATATGGAAGTATTACAACTGTGTCCGAATATATCAAGAAACAACACCTGCTCAAGTCCGAGCTTG : 5900
G5 : GAAGCCGCAAGTTAGGCATGAGCAATTGAGGATATGGAAGTATTACAACTGTGTCCGAATATATCAAGAAACAACACCTGCTCAAGTCCGAGCTTG : 5900
H6 : GAAGCCGCAAGTTAGGCATGAGCAATTGAGGATATGGAAGTATTACAACTGTGTCCGAATATATCAAGAAACAACACCTGCTCAAGTCCGAGCTTG : 5900

J : CAAAGACTTTGCAAAATGGGAGTTCTTAGTTTGTAGCTTAGGTTTGTAGTATAATTATGAATGGATTATCTAGTGAATAAATTTGTATAACAATAAGATTT : 6000
G5 : CAAAGACTTTGCAAAATGGGAGTTCTTAGTTTGTAGCTTAGGTTTGTAGTATAATTATGAATGGATTATCTAGTGAATAAATTTGTATAACAATAAGATTT : 6000
H6 : CAAAGACTTTGCAAAATGGGAGTTCTTAGTTTGTAGCTTAGGTTTGTAGTATAATTATGAATGGATTATCTAGTGAATAAATTTGTATAACAATAAGATTT : 6000

J : TGAACGCACCACTTTGCCACGCACTCCCAATTTGTTAATTAATTTGTCCTGGTGCAGGCAAGAGTACCTTCATTAAGGACTTAATCGATTCCGATTTCT : 6100
G5 : TGAACGCACCACTTTGCCACGCACTCCCAATTTGTTAATTAATTTGTCCTGGTGCAGGCAAGAGTACCTTCATTAAGGACTTAATCGATTCCGATTTCT : 6100
H6 : TGAACGCACCACTTTGCCACGCACTCCCAATTTGTTAATTAATTTGTCCTGGTGCAGGCAAGAGTACCTTCATTAAGGACTTAATCGATTCCGATTTCT : 6100

J : CGTTTGTGGTTTACCTTTGGTGCCTGACCAACCTGAACTGAGCTCCGGGGATCATTCCATTAAGATTACCAACC AAACTGGAGATCTAG : 6200
G5 : CGTTTGTGGTTTACCTTTGGTGCCTGACCAACCTGAACTGAGCTCCGGGGATCATTCCATTAAGATTACCAACC AAACTGGAGATCTAG : 6200
H6 : CGTTTGTGGTTTACCTTTGGTGCCTGACCAACCTGAACTGAGCTCCGGGGATCATTCCATTAAGATTACCAACC AAACTGGAGATCTAG : 6200

J : TTTTGTTCGACGAATAACCGAGGGTGTATCCCACTTGAACGCTTTGGCTTTGTTTGGAGACCCACTTCAGTGCATTTCTAAGCACCCAAACCCACC : 6300
G5 : TTTTGTTCGACGAATAACCGAGGGTGTATCCCACTTGAACGCTTTGGCTTTGTTTGGAGACCCACTTCAGTGCATTTCTAAGCACCCAAACCCACC : 6300
H6 : TTTTGTTCGACGAATAACCGAGGGTGTATCCCACTTGAACGCTTTGGCTTTGTTTGGAGACCCACTTCAGTGCATTTCTAAGCACCCAAACCCACC : 6300

J : TGGCACTTCGTTGTACTTTCTCACATCGTTTGGGAAAAACTGCTAAATTACTCCGCGACCTAGATTCCACGTTACCGTGTAGGGTGTGTATCAAA : 6400
G5 : TGGCACTTCGTTGTACTTTCTCACATCGTTTGGGAAAAACTGCTAAATTACTCCGCGACCTAGATTCCACGTTACCGTGTAGGGTGTGTATCAAA : 6400
H6 : TGGCACTTCGTTGTACTTTCTCACATCGTTTGGGAAAAACTGCTAAATTACTCCGCGACCTAGATTCCACGTTACCGTGTAGGGTGTGTATCAAA : 6400

J : GTTCCCTTGGAAATCTTACGATTGGACCCATTGGCCAGATTGTGGCTGTCCAACTGACCTATCCCTCTACTTTGAAAGCAAAATTGCGAATTTCT : 6500
G5 : GTTCCCTTGGAAATCTTACGATTGGACCCATTGGCCAGATTGTGGCTGTCCAACTGACCTATCCCTCTACTTTGAAAGCAAAATTGCGAATTTCT : 6500
H6 : GTTCCCTTGGAAATCTTACGATTGGACCCATTGGCCAGATTGTGGCTGTCCAACTGACCTATCCCTCTACTTTGAAAGCAAAATTGCGAATTTCT : 6500

J : TGGATCTCAAAACAGGCCAGGGTAAAACCTTTGATCGGGTACCTTCTACTGCGCTGAGAGTAAATATACTCCGAGCTGCGCGCGGATTACTTTGTTGG : 6600
G5 : TGGATCTCAAAACAGGCCAGGGTAAAACCTTTGATCGGGTACCTTCTACTGCGCTGAGAGTAAATATACTCCGAGCTGCGCGCGGATTACTTTGTTGG : 6600
H6 : TGGATCTCAAAACAGGCCAGGGTAAAACCTTTGATCGGGTACCTTCTACTGCGCTGAGAGTAAATATACTCCGAGCTGCGCGCGGATTACTTTGTTGG : 6600

J : TTTAACCAGGCACAGGAAGGAGTTGTTGATCTTAAATCCATATGCCGCTCTCTCCACCCTGATCACCTAGGAGTTTCTTGCACCTGGCCGTTGGTCT : 6700
G5 : TTTAACCAGGCACAGGAAGGAGTTGTTGATCTTAAATCCATATGCCGCTCTCTCCACCCTGATCACCTAGGAGTTTCTTGCACCTGGCCGTTGGTCT : 6700
H6 : TTTAACCAGGCACAGGAAGGAGTTGTTGATCTTAAATCCATATGCCGCTCTCTCCACCCTGATCACCTAGGAGTTTCTTGCACCTGGCCGTTGGTCT : 6700

J : TACTTGTGCTATTTGCTTGTTCGCTCTAATAGATCTACATTTGCCACAGTGGGTGATAAATTCGATTTCGTTACACACGCGGGTGTGTTACGTCAGCGG : 6800
G5 : TACTTGTGCTATTTGCTTGTTCGCTCTAATAGATCTACATTTGCCACAGTGGGTGATAAATTCGATTTCGTTACACACGCGGGTGTGTTACGTCAGCGG : 6800
H6 : TACTTGTGCTATTTGCTTGTTCGCTCTAATAGATCTACATTTGCCACAGTGGGTGATAAATTCGATTTCGTTACACACGCGGGTGTGTTACGTCAGCGG : 6800

J : ACAAACAGATTACTACCGGAAAACCTGCCAGTGGGTACCTTCAGTAACCTCTTCCGTTGGTTTGGTTTCAACCCGCTCTAATGTCGTATAC : 6900
G5 : ACAAACAGATTACTACCGGAAAACCTGCCAGTGGGTACCTTCAGTAACCTCTTCCGTTGGTTTGGTTTCAACCCGCTCTAATGTCGTATAC : 6900
H6 : ACAAACAGATTACTACCGGAAAACCTGCCAGTGGGTACCTTCAGTAACCTCTTCCGTTGGTTTGGTTTCAACCCGCTCTAATGTCGTATAC : 6900

J : TCGCTGGTCTGACCATTACAAAGGGAGAGCCAGCTTGTGTCACCTGTCAGATGCAATCATTAATTTCTTCATCAATGCTGCCGAGGTTTCATGC : 7000
G5 : TCGCTGGTCTGACCATTACAAAGGGAGAGCCAGCTTGTGTCACCTGTCAGATGCAATCATTAATTTCTTCATCAATGCTGCCGAGGTTTCATGC : 7000
H6 : TCGCTGGTCTGACCATTACAAAGGGAGAGCCAGCTTGTGTCACCTGTCAGATGCAATCATTAATTTCTTCATCAATGCTGCCGAGGTTTCATGC : 7000

J : ATTCTTGGCTACTACTACTTGAACGACTTTTGGCCGTTAAACGAACTTTGCACTGTGCATATTAGGGGAGTCCGTTAGGATTTTGGCTGTGCTTTCA : 7100
G5 : ATTCTTGGCTACTACTACTTGAACGACTTTTGGCCGTTAAACGAACTTTGCACTGTGCATATTAGGGGAGTCCGTTAGGATTTTGGCTGTGCTTTCA : 7100
H6 : ATTCTTGGCTACTACTACTTGAACGACTTTTGGCCGTTAAACGAACTTTGCACTGTGCATATTAGGGGAGTCCGTTAGGATTTTGGCTGTGCTTTCA : 7100

J : CACCTGATTTATAGAAACCGGAAACCTCAAGCCGTTGACCAAGGGTTGTTAAACCTTAGGTTTCCGGTTCCGCTCTTCGAAATACAGTGATAGG : 7200
G5 : CACCTGATTTATAGAAACCGGAAACCTCAAGCCGTTGACCAAGGGTTGTTAAACCTTAGGTTTCCGGTTCCGCTCTTCGAAATACAGTGATAGG : 7200
H6 : CACCTGATTTATAGAAACCGGAAACCTCAAGCCGTTGACCAAGGGTTGTTAAACCTTAGGTTTCCGGTTCCGCTCTTCGAAATACAGTGATAGG : 7200

J : GAATAATAACCAAGCTCAAGCAAAATGCCGACTGAACAGGAAATCGAACAACAGCGGGCAACTGCTGAGGCGCAACAAATTAAGCAACCCGAGGAGT : 7300
G5 : GAATAATAACCAAGCTCAAGCAAAATGCCGACTGAACAGGAAATCGAACAACAGCGGGCAACTGCTGAGGCGCAACAAATTAAGCAACCCGAGGAGT : 7300
H6 : GAATAATAACCAAGCTCAAGCAAAATGCCGACTGAACAGGAAATCGAACAACAGCGGGCAACTGCTGAGGCGCAACAAATTAAGCAACCCGAGGAGT : 7300

J : AAACCGGAAACGACGCAACAACAAAGGAGGCAACCCGAGGAGGAGGAGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCA : 7400
G5 : AAACCGGAAACGACGCAACAACAAAGGAGGCAACCCGAGGAGGAGGAGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCA : 7400
H6 : AAACCGGAAACGACGCAACAACAAAGGAGGCAACCCGAGGAGGAGGAGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCA : 7400

J : CACTACTCAGATAGATTTCTTAAGCTTAAAGAGTTCAACTTAAATAATTAACCTCAACCGGCTTGTAAACTCTGGTTCCAGACTGGAAGTCCCAAAGC : 7500
G5 : CACTACTCAGATAGATTTCTTAAGCTTAAAGAGTTCAACTTAAATAATTAACCTCAACCGGCTTGTAAACTCTGGTTCCAGACTGGAAGTCCCAAAGC : 7500
H6 : CACTACTCAGATAGATTTCTTAAGCTTAAAGAGTTCAACTTAAATAATTAACCTCAACCGGCTTGTAAACTCTGGTTCCAGACTGGAAGTCCCAAAGC : 7500

```

J : CCGTGTGCCGCTTCCATCGGAGGGGATGGCGAACATTTTCACAGTCCGACCTTAGACACCGTGCAGGCACTACCTGGAAATCCCTGTATCTTCGCGC : 7600
G5 : GCGTGTGCCGCTTCCATCGGAGGGGATGGCGAACATTTTCACAGTCCGACCTTAGACACCGTGCAGGCGCTGCTGGAAATCCCTGTATCTTCGCGC : 7600
H6 : ACGCGTGTGCCGCTTCCATCGGAGGGGATGGCGAACATTTTCACAGTCCGACCTTAGACACCGTGCAGGCACTACCTGGAAATCCCTGTATCTTCGCGC : 7600

J : CTGGCTACGCCGAAGAGTTGGCCAAAGATTTCAGCTAAGATTGAAGGACTGGGTTTCCAGGATCAATGGCCAAACTCTTTGGGATCTGAGTCCGCT : 7700
G5 : TTGGCTACGCCGAAGAACTGGCCAAATTTTCAGCTAAGATTGAAGGACTGGGCTTCCAGGATCAATGGCCAAACTCTTTGGGATCTGAGTCCGCT : 7700
H6 : TTGGCTACGCCGAAGAACTGGCCAAATTTTCAGCTAAGATTGAAGGACTGGGCTTCCAGGATCAATGGCCAAACTCTTTGGGATCTGAGTCCGCT : 7700

J : ACTGTGCTAGCAATAGTTCCTCACCTTACAGCGAACCAAAAGGCGTATGAATTTGATGGAGGAGCAATCACCGCGATGCAAGGTTGGCAGTCATCCG : 7800
G5 : ACTGGCTAGCAATAGTTCCTCACCTTATAGCGAACCAAAAGGAGTCAATTTGATGGAGGAGCAATCACCTGGATGCTGCATTTGGCAGTCATCCG : 7800
H6 : ACTGGCTAGCAATAGTTCCTCACCTTATAGCGAACCAAAAGGCGTATGAATTTGATGGAGGAGCCATCACCTGGATGCTGCATTTGGCAGTCATCCG : 7800

J : AGAATTATAGCTCACTTCGCGAGGGTCTGCGAGTTACTCCAAAATCGTTTGGAACTATATGTTGGTAAACGCAACAGCCCTCCAGAGGATGGCAAGCAAG : 7900
G5 : AGAATTATAGCTCACTTCGCGAGGGTATGCGAGTTACTCCAAAATCGTTTGGAACTAATATGTTGGTAAACGCAACAGCCCTCCAGAGGATGGCAAGCAAG : 7900
H6 : AGAATTATAGCTCACTTCGCGAGGGTCTGCGAGTTACTCCAAAATCGTTTGGAACTAATATGTTGGTAAACGCAACAGCCCTCCAGAGGATGGCAAGCAAG : 7900

J : GGTATTACCTGAAACACCAAAATATGCGACCTTTGATTTCTTCGATAGCATCATGAAGTCTGGCTGCATACAGCCAGCTGAGGGCTCTATTCCGAAACCAA : 8000
G5 : GGTATTACCTGAAACACCAAAATATGCGACCTTTGATTTCTTCGATAGCATCATGAAGTCTGGCTGCATACAGCCAGCAAGGGCTCTATTCCGAAACCAA : 8000
H6 : GGTATTACCTGAAACACCAAAATATGCGACCTTTGATTTCTTCGATAGCATCATGAAGTCTGGCTGCATACAGCCAGCTGAGGGCTCTATTCCGAAACCAA : 8000

J : CGCCTGAAGAGGTTATTGCTAACGAGACTCACAAACCGCTGGCCCTTGAAGGGCTTCCGCAATCGGAGTTTGCTAATTATTCCTGTGAAGTCACTGG : 8100
G5 : CGCCTGAAGAAATTTATTGCTAACGAGACTCACAAACCGCTGGCCCTTGAAGGGCTTCCGCAATCGGAGTTTGCTAATTATTCCTGTGAAGTCACTGG : 8100
H6 : CACTGAAGAGGTTATTGCTAACGAGACTCACAAACCGCTGGCCCTTGAAGGGCTTCCGCAATCGGAGTTTGCTAATTATTCCTGTGAAGTCACTGG : 8100

J : GGGTAAATTCGGACGAGAATTGAAGAGGAGTTACCGCGGTTCTGAGAGCGACTAATGAGAAATCAGAGATCAGAAACGTCCTTTGTGTAGTGTGTTTCCT : 8200
G5 : GGGTAAATTCGGACGAGAATTGAAGAGGAGTTACCGCGGTTCTGAGAGCGACTAATGAGAAATCAGAGATCAGAAACGTCCTTTGTGTAGTGTGTTTCCT : 8200
H6 : GGGTAAATTCGGACGAGAATTGAAGAGGAGTTACCGCGGTTCTGAGAGTACTAATGAGAAATCAGAGATCAGAAACGTCCTTTGTGTAGTGTGTTTCCT : 8200

J : TCTATTGTGGAATAACCGCACTTATGCGGAAGTTGTGGTTGATTATGTCCTTTGTGCTATCCACACTGTGGCTTTGGAACGTCGAACTACGCGAA : 8300
G5 : TCTATTGTGGAATAACCGCACTTATGCGGAAGTTGTGGTTGATTATGTCCTTTGTGCTATCCACACTGTGGCTTTGGAACGTCGAACTACGCGAA : 8300
H6 : TCTATTGTGGAATAACCGCACTTATGCGGAAGTTGTGGTTGATTATGTCCTTTGTGCTATCCACACTGTGGCTTTGGAACGTCGAACTACGCGAA : 8300

J : AAAACGTAGCGCCGCAAGTCAAAGATGTTGGCGTTGTTACCGCGTATCGGTTGGACTCTGTCTACCTAAAAATTGTAATGGTGTCACTTGTCTCCCT : 8400
G5 : AAAACGTAGCGCCGCAAGTCAAAGATGTTGGCGTTGTTACCGCGTATCGGTTGGACTCTGTCTACCTAAAAATTGTAATGGTGTCACTTGTCTCCCT : 8400
H6 : AAAACGTAGCGCCGCAAGTCAAAGATGTTGGCGTTGTTACCGCGTATCGGTTGGACTCTGTCTACCTAAAAATTGTAATGGTGTCACTTGTCTCCCT : 8400

J : ACATCATCAAATATTGCAAGCTTTATCCTGACCGGCATAGAGTACTCGACACCCGCTCCAGGAGGAGTCGTTGCCACTAAAACCTAATTAATGATATGT : 8500
G5 : ACATCATCAAATATTGCAAGCTTTATCCTGACCGGCATAGAGTACTCGACACCCGCTCCAGGAGGAGTCGTTGCCACTAAAACCTAATTAATGATATGT : 8500
H6 : ACATCATCAAATATTGCAAGCTTTATCCTGACTGGGCATAGAGTACTCGACACCCGCTCCAGGAGGAGTCGTTGCCACTAAAACCTAATTAATGATATGT : 8500

J : CGTGGACGTTTAAA-TAAATTTGCTTTTAATATATTTTTCG : 8541
G5 : CGTGGACGTTTAAA-TAAATTTGCTTTTAATATATTTTTCG : 8542
H6 : CGTGGACGTTTAAA-TAA-TTTGCTTTTAATATATTTTTCG : 8541

```

図 2.9 HeNNV 日本分離株 (J) と米国分離株 (G5、H6、I6) の塩基配列比較

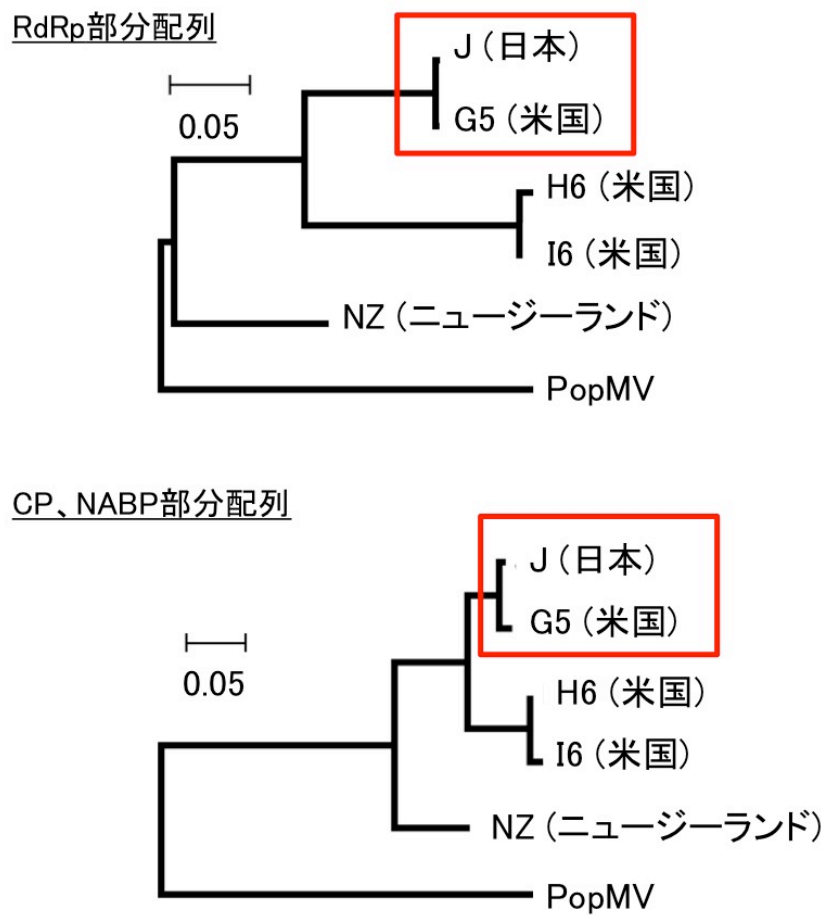


図 2.10 HeNNV 分離株の部分塩基配列を用いた系統樹
 アウトグループとしてカルラウイルス属の poplar mosaic virus (PopMV) を用いた。J 分離株は G5 分離株と最も近縁であった。

← MET domain

```

*           20           *           40           *
HeNNV : MALTYSPIENVLTTFTTTEQSSISAPAVKWKYKDHEAEHFALFNYALPEL : 50
CVNV   : MALTFRSPLEEVLTNFSSTEQSLISKTAINHYSNLESSLFNFNLNVDAY : 50
RCVMV  : MALTYSPIEEVLTSTYTTAEQSEIASTSMRTYKETEIANHQWFNFHLSPV : 50
GarLV  : MALTYSRPVEEVLTSTFTTSEQSEIARGAVQGLLKLLEFNHNLNLFALSPI : 50
PopMV  : MALTYSPIEEMLNSFTTIEQSLVSATALQGIKRENNNYENFNYALPVK : 50

60           *           80           *           100
HeNNV : AKQRLWQSGLYLSPFSALPHSHPVCKTLENYMLYTVLPTYVDNTFYFVGI : 100
CVNV   : SKEKLINSGIYLSPFSGVPHSHPVCKTLENHILYRVLPSLIDSTFTFVGI : 100
RCVMV  : AKQRFNAGIYLSPFVLPVSHPCCKTLENYLLYRVLPSYLDATFFVGI : 100
GarLV  : AKQRLCGSGIYLSPFVYPVSHPCCKTLENYNLYQVVCPLIDHRFYLVGI : 100
PopMV  : SKEKLVRSGIYLSPYSAMPVSHPCCKTLENYMLYRVLPGYLDSSFYFVGI : 100

*           120           *           140           *
HeNNV : KNHKLEFLKQRRKHVNLVESLNRYVTSADKFRYPNDFVTIARS----EETC : 146
CVNV   : KEAKLQFLRORHSHLNLVQLINRYVTSADRLRYPSEEHITPS----KAIE : 146
RCVMV  : KECKIKALKAMNKKLEFCELINRYVTSADQWRYPDTDFVVGGAQAQIS : 150
GarLV  : KQSKLCFLKGRNRKMDMVEICINRMVTSRDKLRVGNDFVQAG----QPGT : 146
PopMV  : KNSKLDLFIKQRNSTLSMTIAINRYVTSADKLRVGNDFVQAG----KQSG : 146

160           *           180           *           200
HeNNV : GLKRHQRFLSNP SLKTL LLDVVAKSQKNLFFHDEIHYWDYDSLTTFLEIV : 196
CVNV   : VCEKWGRFGKSDSLRELLPACITHKPRALFLHDELHYWNLKELKVFLAV : 196
RCVMV  : TLRSLFGSGDADSTKTLIPKVLTVNRRNVFLHDELHYWTPQELGGFLDAT : 200
GarLV  : VKKNSRRTVTFYPELASLPHEIKFRSRALFLHDELHYWSKESLAIFLDQC : 196
PopMV  : GLLAKHGGSSETLSTLVPSLISVKARKLFIHDELHYWSKNDLRCFLQVV : 196


*           220           *           240           *
HeNNV : KPNKLVCTMVYPPPELLVGAKESLNPWCYHFEFVQGDSEFRFYPDGVRTTEGYT : 246
CVNV   : KPEKLLGLTVFPPPELLQGVHESLNPWCYTFEVDKWLHYYPDGVKTEGYT : 246
RCVMV  : GVNKMLATVVI PPPELLIGAGSMNKWCYEFETGETLRFYPDGVAAEGYE : 250
GarLV  : SPELMLATVVI PPPELLKAKESMNKWCYEFVKGPDLYFYPDGVRAEGYI : 246
PopMV  : KPENVLAVTVYPPPELLAGSKI SLNPWCYEFEDTYKDRLLFYPDGVRSSEGYN : 246

260           *           280           *           300
HeNNV : QPLAGGNLLKANSIVLADGTTYGVDLLCSKFAHHLIGLSKGESKFPVDRA : 296
CVNV   : QPRNSGYLLRLSKIHLSDGSTYCVDLVYSCYSHHIIALTLGDAVRKPFNA : 296
RCVMV  : QPMSCTYLLKTKQIITRGGNIYSVDLLCSKFSHHLIAFTRGDLKTKTYHV : 300
GarLV  : QPAGCVYLLTTNKMITPGGQVYCFDIISKFAHHVIAITRGEALVKKENS : 296
PopMV  : QPVGGSYLLKTSRIVLPNGDVYCVDLIHSKFAHHVIAITRGDRVVPCTRT : 296

*           320           *           340           *
HeNNV : FGDFFDAVSAEGLKKICAR-VQGAIPISYGTISRIYRYLRTLKPDTPQSAM : 345
CVNV   : FSGFDATTFQGLKKLDLRGIGPCLPISFSVNNRIYRYLRTLQKPDLASAM : 346
RCVMV  : FSDFEAVSANFLKPI LGQ-EYSCFPISYTNLSKIYRYLCTLSKPDVMSAV : 349
GarLV  : FSNEBAIGSSFASKLLHD-EYPCFPISYEVVMKLYTYLSSLNSPDVKSAM : 345
PopMV  : FGDFFDAISVESLVGVCN-VQACYPISYSTVSKIYRYLQTLV KPDGQSAM : 345

```

MET domain



 HeNNV : AKLSQLLPEPSGYEIKFVQDFSKLVINTPVTQTMFTNNYCEAMLQSLIAS : 395

 CVNV : AKLSQILPEPTSFOIKFIREFSELVIKTETCSNLFQNNVLLDIKNFFASQ : 396

 RCVMV : AKLGQIVPEPTAFELKFTMEFAKLVIKVGTKNSLILPDLWEDFKVFSLSF : 399

 GarLV : AKLRQLVEHPTAFEVQFTTIEFANLYIRCGVNLDTFTPSTKTLKSLAVL : 395

 PopMV : AKLGQIVAEPTGHEVKFVQDFSRFVIGTHSISSIIMPDYKKKIAGFLAGL : 395

HeNNV : APPIIGKYFSKFAALTLDKFIIEELKPLTFNPKLREYKSTSNCNIDYFDFA : 445

 CVNV : LPKRLAATVDAYKISSLDEFLEKMEPYSFTIKLVEATALMDIIFNFDRDI : 446

 RCVMV : LPAVVSKQFSCFVKSTLDDFVSNLCPLRFVQLEVVDCRNIIADLVDKGI : 449

 GarLV : MPALLTKYSKLMRVSFTSFVSHLKPLSFNVKCEIDLKTHAKPCYDRLI : 445

 PopMV : LPHFASRMFAAYREVTLDNFISTLRPFSEIQPSSLDESLEWDELHFYDMS : 445

HeNNV : ADLEP-----QTVLQLLDDGFQSSRMFYGERTRALYYCNEPSFSCFD : 489

 CVNV : EGFEHEVDIVAELEAFANPKNPHAHNAKTTPYFCEPYCDAVEFCVQKMAK : 496

 RCVMV : AIIIDG----- : 454

 GarLV : PPGID----- : 450

 PopMV : FDIEAHMDTPSKMDESFKKDGKKAIPDRDGEPYSMVLVDAQSGHVDYIELE : 495

HeNNV : DSVLERTTAYFVNAHGSESQVRFSLGRKHFSCAFLRKC-----SLTAQ : 534

 CVNV : LVLVKAAGLLYHGMPVMGGHQAHDFLDVARRIPLVDYCCGFGLEEEIIRL : 546

 RCVMV : --LDPEPTPRPSIDPTEPQVSLDDRESALYFNAHVETWE-----VFEVD : 497

 GarLV : --SI MNCTEFGKITSGKENFSREPAPYSFSLNETCHLHCA-----PEELL : 493

 PopMV : IRNLVAVLARYIARSFGNSQVCEFSFDMVADACKNVLLRS-----QGLGW : 540

HeNNV : ACWGVTTETLRLIRKRVEAILVRFYNFSEFLEPSVWFAETKRRRNVRVYLN : 584

 CVNV : VFIEKFIGLVKHSRSNVLEIPTGLDWFMPRRRNVFYLTCTPEAIVATK : 596

 RCVMV : EFIKLLGLWLSNLSFPEICVLEFDGLERFAHQHFGSETINNLIRTDQRF : 547

 GarLV : IANMKFLGDLSEFTFSSTDQVLAGAATVFRPLYQFLFSILG-----EYCV : 538

 PopMV : LLLHELGREVIEMIQRKAGAYCAHLRVTFSSGSSDLTWFLSRKRGR-LY : 589

HeNNV : ATDEIPTGLFCRNDLYKSVIGETIILKRQARTPAEIPAPVNESHTTEAITM : 634

 CVNV : LMRGMWDNVVNELAASSALIKRIGITLSDRNTPVAPLEVVLPPAPEPIKQ : 646

 RCVMV : HFWDSVFIISAKLSKQSRGITSLPQGRFLTYHSVATLQPLSKEPTVAIVG : 597

 GarLV : DYCLMQAARKQRIEKNERTAAKVLALPWFSNESYGDVTVYPAPVFNCL : 588

 PopMV : IKDYHGYAFDHSDAFSAVLEDIQRWKIPAIKEGLPLVREIEVVAPTDAE : 639

HeNNV : LELEPDS-----DSDDGVALPETIQSFTCKCGCILPFFNVIGADLCI : 676

 CVNV : EGSNGSVGVSNELAEDAIAANFTPPAFIRNFSCSCGLEMPISSVVGDFVY : 696

 RCVMV : ELPIEEV-----KREDENFALLEYPPLSCACGLSIPCSEALSLNDFD : 639

 GarLV : EEENWGA-----ADTVDDIEPMLINLENVCVCGAGIQWTVAFHVLLD : 630

 PopMV : MCKLLEE-----RLKDPNMPPTAVSAEACACGANLGLGVFEGAEFVN : 681

HeNNV : **I**PT**P**DK**L**K**G**RTAGWY**S**K**D**G-R**P**Y**S**Y**N**GG**A**H**K**S**L**GW**P**I**W**L**D**T**F**L**E**L**N**A**H**G**Y** : 725
 CVNV : **F**D**L**P**D**V**L**P**G**R**R**A**A**W**F**T**K**D**G**S**T**A**Y**T**Y**K**G**G**K**H**A**S**M**G**W**D**E**R**L**D**L**L**L**E**I**H**G**F**E**G : 746
 RCVMV : **I**T**F**R**D**A**L**R**N**R**V**A**A**Y**F**S**R**D**G**-**S**S**Y**S**Y**NG**G**S**H**A**S**Q**G**W**P**V**E**L**D**D**L**L**L**V**H**G**E**N**P** : 688
 GarLV : **V**S**I**D**D**R**L**L**N**R**R**A**A**F**Y**S**K**G**C**-**F**G**Y**S**Y**NG**G**N**H**V**G**H**E**W**L**D**N**F**D**S**F**L**A**I**N**G**H**D**L** : 679
 PopMV : **I**L**M**P**D**K**V**G**S**R**K**C**G**W**Y**S**M**D**G**-**S**P**Y**S**Y**NG**G**S**H**T**S**Q**G**W**P**E**W**I**D**V**L**L**T**L**N**G**V**G**Q** : 730

AlkB domain

HeNNV : **G**P**F**D**S**V**L**V**Q**E**Y**S**N**D**S**G**I**G**Y**H**A**D**N**E**E**I**F**K**P**E**G**A**I**L**T**M**S**I**R**G**S**A**S**F**G**L**K**C**S**A : 775
 CVNV : **S**L**F**D**S**A**L**V**Q**E**Y**E**Q**G**A**R**I**G**F**H**S**D**D**E**S**I**F**K**V**G**S**E**I**L**T**M**Q**L**K**G**T**S**R**F**A**I**Q**G**S**R : 796
 RCVMV : **V**A**F**D**S**V**L**V**Q**R**Y**N**Q**G**G**G**I**G**F**H**S**D**N**E**S**I**F**Q**E**G**G**S**I**C**T**F**Q**F**G**G**S**C**I**F**S**F**S**C**S**L : 738
 GarLV : **N**Y**F**N**C**V**L**F**Q**Q**Y**D**G**G**H**G**I**G**F**H**S**D**D**E**E**L**F**E**K**N**S**K**I**L**T**I**C**I**Q**G**D**C**E**F**R**F**R**C**A**T : 729
 PopMV : **V**G**Y**D**C**L**L**A**Q**E**Y**A**Q**G**G**K**L**G**F**H**R**D**D**E**P**N**L**D**V**G**A**S**I**F**T**V**N**L**Y**G**E**A**T**F**M**L**K**G**K**G : 780

HeNNV : **G**E**C**G**F**E**H**L**E**C**T**S**F**V**M**P**S**G**L**Q**Q**T**H**K**H**R**V**F**G**T**K**G**N**R**I**S**L**T**F**R**M**L**R**D**S**A**Y**L**S**S : 825
 CVNV : **C**Y**G**S**S**A**L**L**G**G**C**H**F**T**M**P**A**G**F**Q**E**T**H**K**H**S**V**A**E**C**S**S**G**R**T**S**I**T**F**R**V**L**K**G**T**E**Q**P**S**A : 846
 RCVMV : **G**V**H**H**N**V**L**K**G**D**C**K**F**T**M**P**A**G**F**Q**E**T**H**K**H**K**V**S**E**C**T**E**G**R**V**S**F**T**F**R**L**R**I**R**E**S**G**L**L** : 788
 GarLV : **G**E**T**G**F**F**M**E**A**P**K**Q**F**M**M**P**E**G**F**Q**E**S**H**K**H**A**V**R**G**C**S**P**G**R**I**S**A**T**F**R**R**A**K**V**P**P**V**D**D**F : 779
 PopMV : **H**L**T**K**L**H**L**R**P**S**Q**C**F**T**M**P**H**G**F**Q**E**S**H**K**H**A**V**E**G**C**S**K**G**R**V**S**L**T**F**R**V**L**K**K**R**G**L**A**L**V : 830

HeNNV : **D**G**S**D**N**G**L**G**S**D**H**D**E**E**D**H**A**N**F**T**E**S**S**----- : 848
 CVNV : **P**L**H**P**T**N**E**K**V**E**P**G**G**G**A**V**S**S**R**L**G**A**P**E**E**L**S**-----AF : 875
 RCVMV : **E**E**I**K**P**D**G**R**G**P**E**L**I**E**E**L**K**M**E**G**D**S**T**S----- : 812
 GarLV : **L**T**S**E**N**G**K**V**D**S**E**N**G**V**D**D**G**G**E**S**E**C**L**S----- : 803
 PopMV : **R**R**L**S**S**P**E**P**A**N**G**P**E**G**D**S**T**A**S**A**E**A**D**D**G**A**K**M**V**S**A**A**G**A**H**S**R**V**P**T**V**R**S**P**M**E**V** : 880

HeNNV : --**E**T**F**G**V**K**L**D**L**R**K**T**H**P**L**N**A**F**K**P**I**E**V**P**A**D**G**-**D**C**F**W**H**A**V**G**Y**L**I**G**L**N**G**S**E**V**K**K : 895
 CVNV : **D**Y**Q**I**G**P**V**R**V**E**N**V**G**G**P**R**A**G**S**Y**T**L**T**D**V**P**G**D**G**-**S**C**F**F**H**A**V**G**L**S**F**N**L**T**G**L**A**L**R**R : 924
 RCVMV : **S**E**V**I**I**F**D**V**E**I**T**A**I**D**L**T**P**E**H**L**I**S**I**E**V**P**G**D**G**-**N**C**F**W**H**S**L**G**Y**F**L**G**V**E**G**P**E**L**K**R : 861
 GarLV : **F**I**D**N**L**G**V**S**H**T**V**Q**K**N**V**N**I**A**P**F**V**V**R**E**V**S**G**E**N**N**M**C**F**W**N**C**L**S**F**L**N**L**D**A**L**P**L**K**N** : 853
 PopMV : **N**Y**D**L**Y**G**V**P**I**E**A**E**T**F**E**G**L**D**R**F**K**R**V**Q**V**P**G**D**G**-**Y**C**F**W**H**S**I**G**F**L**M**G**L**E**G**T**E**L**K**K : 929

OUT-like cysteine protease

HeNNV : **A**V**A**E--**R**S**K**V**E**L**K**A**N**A**E**L**T**A**Q**M**G**N**K**V**F**A**E**N**E**A**F**A**A**A**C**V**L**L**D**I**S**I**T**F**I**I**S**D : 943
 CVNV : **A**L**L**D**A**A**P**E**I**G**G**M**F**P**A**E**A**F**A**E**L**R**G**G**G**A**V**S**D**V**C**V**C**Y**V**A**H**A**L**K**S**S**I**A**V**I**S**H**H**E : 974
 RCVMV : **I**A**R**K**R**F**K**N**E**L**G**L**C**N**D**D**F**P**N**A**Q**L**E**G**D**N**F**A**E**L**V**V**C**A**C**S**K**L**F**N**I**E**F**I**V**C**S**L**E** : 911
 GarLV : **N**L**S**K**G**L**E**K**L**R**G**T**T**I**H**A**T**L**A**E**Q**L**A**P**G**A**M**A**E**D**D**V**I**S**L**C**C**Q**I**F**S**L**E**I**V**V**H**S**L**S : 903
 PopMV : **I**C**K**R--**L**S**K**D**L**I**E**S**D**L**S**L**A**K**Q**Y**E**G**A**T**F**A**B**A**E**V**I**A**S**V**V**H**H**Y**D**F**S**I**Q**V**Y**Y**P**E : 977

HeNNV : **E**G**H**S**V**I**F**N**K**-**E**G**S**T**L**M**L**Y**I**K**L**Q**N**T**H**C**S**P**L**L**P**R**N**D**C**V**I**V**A**G**A**S**A**L**S**R**P**V**K**D : 992
 CVNV : **G**--**C**M**R**V**F**C**P**D**N**W**E**N**K**I**D**L**L**H**K**D**G**H**Y**N**V**V**N**Y**K**N**D**C**A**L**L**A**V**A**E**T**L**G**R**T**K**R**E** : 1022
 RCVMV : **G**R**E**S**M**R**F**M**P**P**E**G**E**I**N**I**C**V**L**L**G**F**G**H**A**H**Y**K**P**M**V**R**N**D**C**V**P**R**A**I**A**E**A**L**G**R**S**L**R**E : 961
 GarLV : **L**G**C**T**T**N**F**A**T**-**E**D**A**E**K**R**I**D**I**L**H**D**N**E**H**F**S**L**L**F**Y**K**N**D**C**F**V**S**A**V**A**Q**T**F**S**R**D**T**N**E : 952
 PopMV : **D**N**V**L**W**N**L**G**V**-**L**A**E**K**R**S**T**L**L**F**V**K**V**C**T**L**S**P**W**F**P**K**N**D**C**V**I**T**A**T**V**E**A**L**G**R**S**Y**A**D : 1026

C23 family endopeptidase

```

                1060          *          1080          *          1100
HeNNV : VYKVLMRREHSLIFKQLCAGEGLSLMLLGGQFFSIFDIHAYINFEGEHMEV : 1042
CVNV  : VTEVVCRAKHGGLLRSMRTGEGLVKVELLGELEKIFSIKALVKCNGQLHRL : 1072
RCVMV : VFGVLSRKENSLLYALLGGSGGVDIDDLEDFENLFDIRAYVDLDGKWYSL : 1011
GarLV : MYRVLADKKFDELTELLRLGCGLTIEDLEVGFKLNIKAHTMKDGEYLQI : 1002
PopMV : VEGVLSRVSNSHILAEVNSGEGVSSFILEEYFKLEGIQASIIWDGELICL : 1076
    
```

```

                *          1120          *          1140          *
HeNNV : NESGSLKRCFTVEQEHIAHNVKMGCSAITPTMTGSN-----NAVSLKSLK : 1087
CVNV  : NPEGKILGHYRLEDGHIQVDKGLIKQLGSAPVKVIEHP-----VHGSGMV : 1117
RCVMV : NPKCHLERHFNLNDGHMTFKPKDGVLELFKTKKACVLOQKGNKKLPEDCAL : 1061
GarLV : NDSCEINGFYSLTDEHLVACPPFSKSLFATKTI LNS----NEHLAVTAIK : 1048
PopMV : NEIGREKKA FEIVEGHMTHLPARKAQNMPQLLSKNV-----EVFSRRALS : 1121
    
```

```

                1160          *          1180          *          1200
HeNNV : ILKACGTELVYTVVEERARRIADSLHSGTTGAVCSLNFN--GTPNLLQGL : 1135
CVNV  : LIAAVATOLSFEINAEIGDKLAELVSCRTGVISSQLFN--GRQKLTIPA : 1165
RCVMV : KLRLSCTVLPYNWDARRANALLGSMHVARTGVLSSELFNGVALRTVQGPS : 1111
GarLV : MLREVGSELIYPASLDRASNFRSLKGCCTGIRSSTLFAGLSSRLKEG-- : 1096
PopMV : ILLRKACTEIHYNVSRRRACELADSLLOQSTGATCSATFN--LCGSLIEHV : 1169
    
```

HEL domain

```

                *          1220          *          1240          *
HeNNV : NPDWEARNVVAIILGTFGSGKSTLFKDLFR--RNPGLKLCFVSPRRSLAQE : 1183
CVNV  : GSDGKSRVNLITGVFGCGKSTLMKRSFES--GLGSKCYFVTPRRSLADI : 1213
RCVMV : KQENQQREVCAIILGTFGAGKSSLLSRLFP--RLKGCATHFVSPRKGLATD : 1159
GarLV : -HNDHERSLTTVLGTFGSGKSTSLIKRAVVNFKKSGRVVFHVSPPRSLADA : 1145
PopMV : EVKDHAREVTAVLGTFGAGKSRLFKKEFIS--KSPGRCVTFVSPRKALAEA : 1217
    
```

```

                1260          *          1280          *          1300
HeNNV : IKESVFGKCTSPDGK-----FKIVRNKKNCFNVCTFETFLKLAAGLKAG : 1228
CVNV  : FSDELTS-----GRIKTKTVVVOYQYEFKFLRMLESVEPR : 1247
RCVMV : MRG-----LMSSALNCTGPETKMKKAIRKANWEVSTFEIIFLLNIDRIKDG : 1204
GarLV : LIQSLGLTDRSGTCIDGKGGSKRKGGKSSQNTFVRTFETFLIQNSRVGGN : 1195
PopMV : VKTEIFGESREGKKKG-----RNGKRDGKSANWNVTFTEVFLKMAAKSKPG : 1263
    
```

```

                *          1320          *          1340          *
HeNNV : HTLVLDDEIQLYPPGYLDLVACLVPRSCHLFVVGDPCCQSNYDSEGDRSIFS : 1278
CVNV  : DVVLFDEMQLFPHGYFDLTFSIMSQEVPTVCLGDLCCSDYDCATDRSELG : 1297
RCVMV : TTVFLDEIQLFPPGYLDTVCGLLSDGCEIFVIGDPCCSDYDSEKDRSILT : 1254
GarLV : DLVFFDEIQLFPPGYLDYTPMLLPATVQFFILGDP LHS DYDSMNDRHVFL : 1245
PopMV : QVVIIDEVQLYPPGYLDLALTLMRSDVNVFVVGDPCCSDYDSEKDRVFE : 1313
    
```

```

                1360          *          1380          *          1400
HeNNV : GAASDIHKMLANAKYKFVTRSRRFFNKTFSGRLPCAMDDSKLVVSEEYFM : 1328
CVNV  : CYQSDMQRLLQSAYTYIYTRSRRFQNSNEAGRLPCQFQPEYFTNHEDFTI : 1347
RCVMV : ELGSDVDRLLLGKDYKYVSTSRRFGNARFEGRLPCFFLTGTLTFDEPFVC : 1304
GarLV : GYESDICNLLKGREYKYNILSRRFNSNKMFASRLPCSFKSECFTTDEPYVM : 1295
PopMV : GVPSDISRLLANQTYKFVCRSRRFKNEIFIGRLPCKLQSSDCELREEYYC : 1363
    
```

```

HeNNV : ARSFE*EEVRSFSKVFT*EVFLVPGF*DEKKIIKAHFPN-CENILTFGESTGRT : 1377
CVNV : LHGFESLNDIAG--LDCILVSS*FNEKTAVKALTFG-RVSVQTFGESTGLT : 1394
RCVMV : QNGLNGALEVDRKFR*EVVLVSS*FMEKHVIQAIYGE-SQEVLTTFGESTGRT : 1353
GarLV : LQGFGANLDEIKNFSEVYLVAS*FVEKNFVKAHLGE-NVKVLTTFGESTGLT : 1344
PopMV : CSNFEDVDSLAE*PYRKVFLVSS*FDEKRIIRAHPDPGVQCLTFGESTGMT : 1413

```

HEL domain

```

HeNNV : FEYGSILIT*OSGFSVCE*QRWITALSRFSRNLL*FLNLTEASFEAIAENMDD : 1427
CVNV : FNSGAI*FISEVSKLASE*QRWLTALSRRF*RNLT*EVSDLGCDSSMLAEVFSG : 1444
RCVMV : FNEGILLI*SESSILTSE*KRWLTALSRRF*RNIC*FLNALESSFDEIAKRFSG : 1403
GarLV : FERGSVFIT*ESAFKTSE*CRWVTALSRRF*SRNLI*LINMLETTFESLASQRST : 1394
PopMV : FKYGTI*LITPGASKVN*ERRWLTCLSR*FAYNVAFL*NMSGVSYPTLVDMYSN : 1463

```

```

HeNNV : RALGKFF*TQSAS*IDDLRKILPGE*PHFADY*VPKI*GKDHC*VREDKLAGDPW : 1477
CVNV : RVLGRF*LSGKANV*CDLRGLLAGSPDL*QEDF*PTTV*GKNQGL*VEEKV*VGDPW : 1494
RCVMV : KVLGSF*LSKQAKV*DDLKMLPGN*PKFV*ESFVQ*PIGK*SFGV*FEEKLM*GDGPW : 1453
GarLV : TVLGRF*LRGTAD*PSHTLENL*PGKPIA*OYGET*HCVGR*NLGV*REAKLQ*GDGPW : 1444
PopMV : RALGKF*FCGRAGL*DDLL*LEHLP*GDENF*DSFQ*HKIG*KAAGL*KEEKV*AGDPW : 1513

```

Autocatalytic cleavage site

```

HeNNV : LKTMVFLG*QEDVEKSE*EIEEA*ILAE*PWFK*THL*PLCE*MESV*RASW*VQNFKA : 1527
CVNV : LKAMLFLG*QETDE*QEVAPEVAE*VALE*VEFK*THA*PRCE*LEGVR*ARWHEK*IQA : 1544
RCVMV : LKSELFLG*QDEEM*ADEQMAE*FIQQ*SWFK*THL*PKCE*RETL*RARW*VHRIMA : 1503
GarLV : LKSEIFLG*QEDDM*QEI*EEVAEL*VQKE*IFK*THL*PRCD*LEGL*RAQW*NDKILS : 1494
PopMV : LKCM*LDLS*QEDMEAE*EVYE*ICCAE*PWFK*THL*PRSE*LESIR*AGWV*HKIME : 1563

```

POL domain

```

HeNNV : KENRE*VRKGYLVSD*QFTD*EHSKNR*GKIL*TNAER*FEA*IYPR*HKNSD*TVTF : 1577
CVNV : KEFRE*KRMGYLVSE*QFTD*EHSKN*NGK*LTNAER*FET*IYPK*HKNSD*TVTF : 1594
RCVMV : KEDRE*FHFKDLRTE*QFAD*DHGK*NRGAR*L*TNAER*FESI*YPRH*KASDT*LTF : 1553
GarLV : KEARE*FRN*LVTE*QFTD*CHSK*QK*GKIL*TN*QAE*RFE*TIYPR*HRASD*LTF : 1544
PopMV : KEARE*VRIK*DLIT*NQFT*DQHS*KNHG*VKLT*NAAER*FET*IYPR*HRASD*TATF : 1613

```

```

HeNNV : LMAV*KKRLRFSK*PMVECA*KLNEA*RGY*GKYL*LDNF*LK*FV*PLKA*QHNPE*FMA : 1627
CVNV : IMGAR*KRLRFSK*PLVEAR*KLQDA*KVYGE*FMLQ*NFPK*YV*PLRK*QHNKG*FMD : 1644
RCVMV : LMAV*KKRLRFSK*PHVECA*KIKQAD*MGFP*LLKE*FLK*KV*PLPN*RGRPE*LMA : 1603
GarLV : LMAV*KKRLRFSK*PHLECA*KLKEA*EYPG*KFLL*DEF*LK*RIP*LK*PH*HRD*LMS : 1594
PopMV : LMAV*KKRLRFSK*PHIEMA*KLREAE*ELFGE*SMLK*LFLK*HV*PLKE*GHNCE*FME : 1663

```

```

HeNNV : RSV*RD*FE*EKKTS*KSAA*TIENH*SGR*SCR*DWLAD*VGLIF*MKSQ*ICTK*FDNRF : 1677
CVNV : KAL*RD*FES*KKVS*KSAA*IIANH*AGR*SCR*DWLAD*VGLV*F*MKSQ*HCTK*FDNRF : 1694
RCVMV : EAV*RD*FEL*KKISK*GATI*QNHAG*RSCR*DWLAD*GLV*F*MKSQ*LCTK*WGNRF : 1653
GarLV : EAL*H*DFE*EKKVS*KSAA*IIENH*ANR*SCD*WLAD*VGLV*F*MKSQ*ICTK*WGNRF : 1644
PopMV : RAN*RD*FEL*KKTS*KSAA*TIENH*AQR*SCR*DWLAD*VGLV*F*MKSQ*LCTK*WGNRF : 1713

```



```

      1760          *          1780          *          1800
HeNNV : R V A K A A Q S I V C F Q H S V L C R F A P Y M R Y I E M K L Q E A L P K N F Y I H S G K G L E E L : 1727
CVNV  : R D A K A A Q S I V C F Q H A V L C R F A P Y M R Y I E M K L Q E V L P S N F Y V H S G K G L D E L : 1744
RCVMV : I K A K A A Q T I V C F Q H A V L C R F A P Y M R Y I E K N P S E A L P R N L Y I H S G K S L E E L : 1703
GarLV : R S A K A A Q T I V C F Q H S V L T R F A P Y M R Y I E K K V L E V L P K K Y Y I H S G K G L E E L : 1694
PopMV : R N A K A A Q S I V C F Q H A V L C R F A P Y M R Y I E M K L N E V L P P N F Y I H S G K S L E E L : 1763

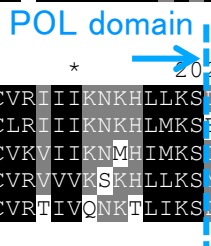
      *          1820          *          1840          *
HeNNV : N K W V L G G N F R G I C T E S D Y E A F D A S Q D Q H I V A F E L A C M E Y L G L P K D L I A D Y : 1777
CVNV  : S E W V K K G K F E G I C T E S D Y E A F D A S Q D Q Y I M A F E L K V M E Y L G I P K D L I A D Y : 1794
RCVMV : N E W V K V A K F E G I C T E S D Y E A F D A S Q D H Y I M A F E V S L M R Y L G L P V D L I E D Y : 1753
GarLV : N Q W V C D N K F H G I C T E S D C E A F D A S Q D Q Y I M A F E I A L M E Y L G L P R S L I N D Y : 1744
PopMV : D A W V K R Y K F S G V C T E S D Y E A F D A S Q D Q Y I M A F E L A V M K H L R L P A D L I E D Y : 1813

      1860          *          1880          *          1900
HeNNV : C Y I K T H L G S K L G S F A I M R F S G E A S T F L F N T M A N M L F T F L R Y E L T G K E E T S : 1827
CVNV  : V Y I K T H L G S K L G N F A I M R Y S G E A S T F L F N T M A N M L F T F L R Y D V K N E E I C : 1844
RCVMV : K F I K T H L G C K L G N F A I M R F S G E A S T F L F N T M A N M L F T F L R Y D L N G S E Y I C : 1803
GarLV : K Y I K T H L G C K M G A L A I M R F S G E A S T F L F N T L A N M L F T F L R Y D L N Q E S I C : 1794
PopMV : K Y I K T H L G S K L G S F A I M R F S G E A S T F L F N T M A N M L F T F M R Y D M N G S E A V C : 1863

      *          1920          *          1940          *
HeNNV : F A G D D M C A S K R L R V S V E H E S F I G K L K L K A K V N F T T N P T F C G W C L T T D G I F : 1877
CVNV  : F A G D D M C A N T K L R K V D T H E S F L S K L K L K A K V G F V N K P T F C G W N L C S D G I Y : 1894
RCVMV : F A G D D M C A S K R L R V S D K F E G F L S K L K L K A K V D F V A S P T F C G W N L V N F G I Y : 1853
GarLV : F A G D D M C A N R R L R V N L K H E D F L G K L K L K A K V A F T K R P T F C G W N L T H F G I Y : 1844
PopMV : F A G D D M C A S K H L R V Q S E H D K F L D K L K L K A K V Q F T E K P T F C G W N L C P D G I Y : 1913

      1960          *          1980          *          2000
HeNNV : K K P Q L V F E R L C I A K E I N N L A N C I D N Y A I E I S Y A Y K L G E A A V R H M S I E D M E : 1927
CVNV  : K K P Q L V L E R L C I A K E I N N L T S C I D N Y A I E V S Y A Y R M S E K A T M R M S E E E L D : 1944
RCVMV : K L P Q L V F E R M C I A K E R N I L A D C I D N Y A I E V S Y A Y K L G E L A T N H M D E E E M E : 1903
GarLV : K K P Q L V F E R M C I A K E I N N L H N C I D N Y A I E I S F A Y V K G E L A V C H M D K E E L D : 1894
PopMV : K K P Q L V L E R M C I A R E I N N L A N C I D N Y A I E V A F A Y K M G E R A T N R M S E E E L N : 1963

```



```

      *          2020          *
HeNNV : S Y Y N C V R I I I K N K H L L K S D V A K T E F A N G S S - - - - : 1956
CVNV  : S H Y N C L R I I I K N K H L M K S E A A N I F K A S D V G L G I : 1977
RCVMV : A F Y N C V K V I I K N M H I M K S O V A N I F R N N P C - - - - : 1932
GarLV : A F Y N C V R V V V K S K H L L K S N V R E L F K N E V E T - - - : 1924
PopMV : S H Y S C V R T I V Q N K T L I K S D V W G V F S R G S E - - - - : 1992

```

図 2.11 HeNNV を含む複数のカルラウイルスにコードされる RdRp アミノ酸配列のアライメントと予測される機能ドメインおよびモチーフ配列
 カルラウイルスの RdRp アミノ酸配列に予測される MET、HEL、POL ドメインを青色の破線で示した。AlkB ドメインは緑色の破線、OUT 様システインプロテアーゼは赤色、C23 ファミリーエンドペプチターゼを紫色の実線で示し、Autocatalytic cleavage site (自己触媒的切断部位) は紫色の四角で示した。HeNNV に予測される HEL ドメインと AlkB ドメインの部分配列はそれぞれ青色、緑色の実線で示した。

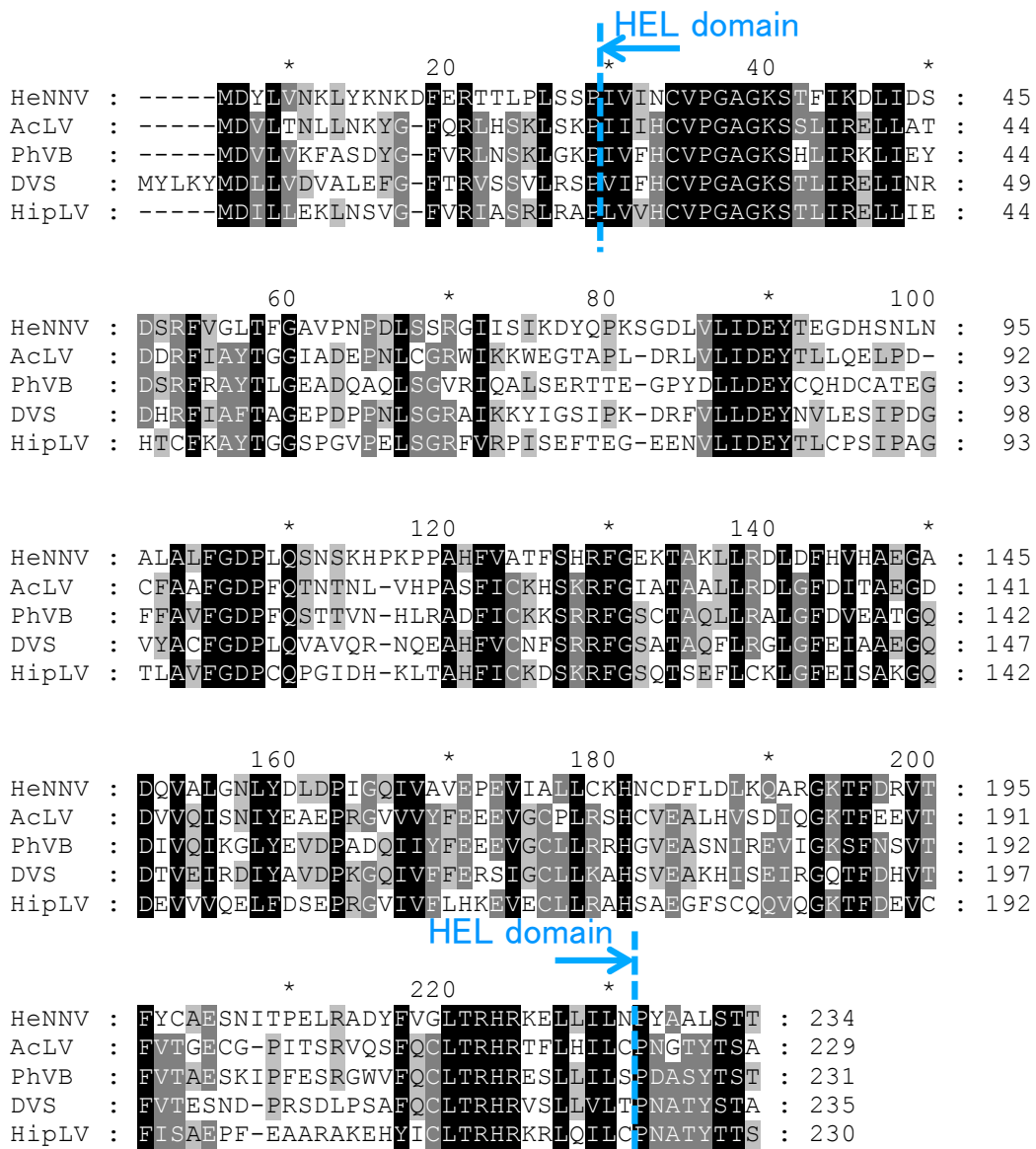


図 2.12 HeNNV を含む複数のカルライウイルスにコードされる TGBp1 アミノ酸配列のアライメントと予測される機能ドメインおよびモチーフ配列
HEL ドメインを青色の破線で示した。

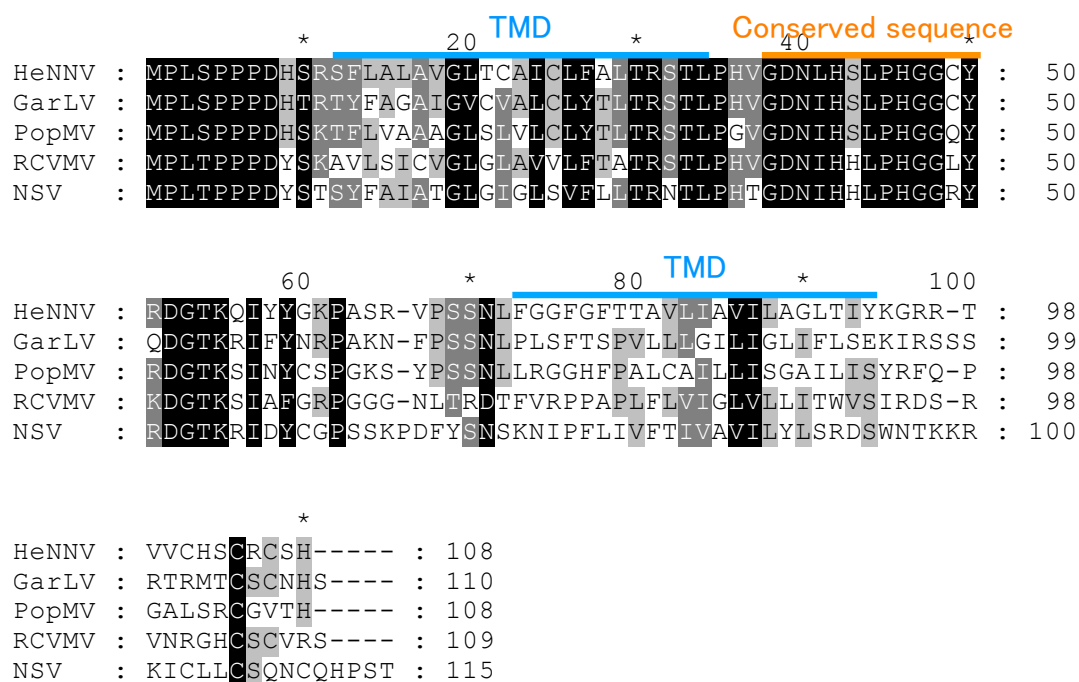


図 2.13 HeNNV を含む複数のカルライウイルスにコードされる TGBp2 アミノ酸配列のアライメントと予測される機能ドメインおよびモチーフ配列
 膜貫通領域 (TMD) を青色で示し、TGBp2 保存配列 (Conserved sequence) を橙色で示した。

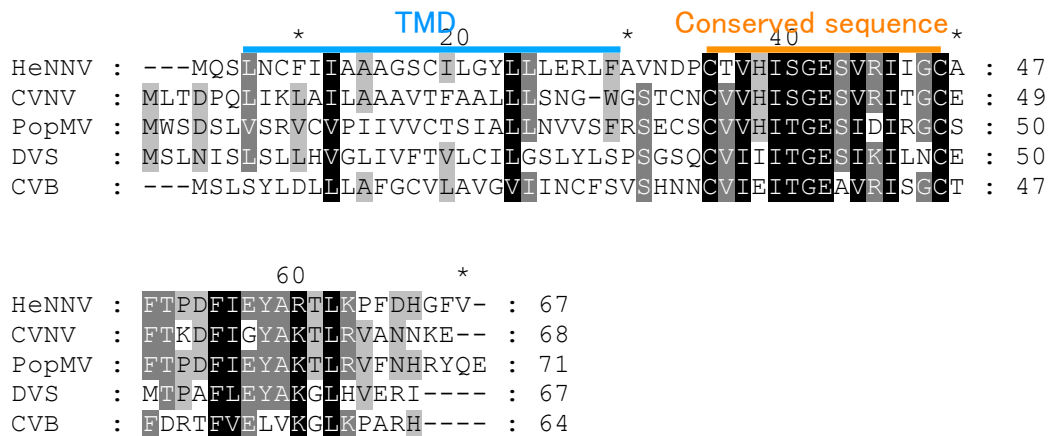


図 2.14 HeNNV を含む複数のカルラウイルスにコードされる TGBp3 アミノ酸配列のアライメントと予測される機能ドメインおよびモチーフ配列
 膜貫通領域 (TMD) を青色で示し、TGBp3 保存配列 (Conserved sequence) を橙色で示した。

```

HeNNV : -----*      20      *      40      *      : 41
RCVMV : -----MPTQEIEIQQRRTAEAQQIERNRRSNTETQQQRQATPPRR : 21
GarCLV : MSTSETEEQRSRRQASERSEVTRRKNDAAVRARQDA AIDS EAPVDVQETS : 50
GarLV  : -----MTNEEEELNRRVRLPTRNPGTELEGRSKA : 30
CLV    : -----MPEKRLEEDVGSQGQTGPNPPQQHQEQSAVSGMV : 37

HeNNV : QQA D D E D E E QAVGLEK T L L D R F L K L K E F N L N L T A T R L V N S G F E T G R P K : 91
RCVMV : G G S D V L E F I K D E E K L Q E N L L K R F Q K L K E L K V K S L S S V V F N G G W E D G R V R : 71
GarCLV : V N D V D L R Q M E N R V Q E A K R V L E R F N K L K K F Q A D N M T A G E I K N G G F E T G R P K : 100
GarLV  : V N D V G V M E R E G F E A V L R R S E D R F N K L K E K C I A E L S C I N V T N C G W E S G R P K : 80
CLV    : V N E V D L R N L Q N R V E E A E K F M Q R F Q K L K E F N S Q N L T A G E L K N G G F E S G R P P : 87

HeNNV : A R V A A S M R G D M A N I F T S P T L D T L Q A L P W N P V S S R L A T A E E L A K I S A K T E A : 141
RCVMV : L P V S D K M K V D P S N V F S S P T L D D L Q K L G W R A E S N A C A T A E E L G K I S A Q L E A : 121
GarCLV : L N I A A N L R G D T A N V F T R P S M D A L I A L D F K A E S L A V A T A E D L A A I T A K F E Q : 150
GarLV  : A Q L A D S L K G D A S N I F T R P S M D A L L V R N Y A P E S N N L A T A E E L A K I S A K V Q A : 130
CLV    : A K I S E H L R G S T A N V F T R P S L D A L Q M M D F K P E S N M I V T A E E L A A I T A K I E G : 137

HeNNV : L G F P R D Q L A K L F W D V S R Y C A S N S S P Y S D P K G V I E F D G G A I T R D A A L A V I : 191
RCVMV : L G V P R E K M A A A F W D I A R Y C T S V G S S P F V N P K G T I D F P N G S I T R D A A F A V I : 171
GarCLV : L G V P T E R L A P L C W S I A R Y C A D T S S S Y V A D P K G T F E Y P G G A I T R D A V Y A V I : 200
GarLV  : L G A P E E C L A E V F W D I C M Y C T T A G S S P N V N P K G T I S I G R V V T R D M V V A V I : 180
CLV    : L G V P T E R S A P I C W A V A R Y C A N T S T S P Y T D P K G V F E F P G G A I T R D A V F A V I : 187

HeNNV : R D I S S I R R V C R S Y S K I V W N Y M L V N A Q P P E D W Q A K G F T E N T K Y A A F D F D S : 241
RCVMV : K K F S S L R Q V C R S F A P I T W N Y M H I T N Q P P E D W A K K R L K Y D D R F A A F D P F D F : 221
GarCLV : K E V T T L R A F C R A F A P V V W N E M L I A K R P P A G W Q T K G Y T A S T K F A A F D T F D Y : 250
GarLV  : K E Y T L R Q V C R C Y A P V V W N Y M L L N E Q P P A N W D A K G F T E N T K Y A A F D T F D A : 230
CLV    : R E V T T L R A F C R A F A P I T W N Q M L F A K S P P E N W Q A K G Y T Y E T R Y A A F D V F D F : 237

HeNNV : I M N S A A I Q P A E G L I R K P T P E E V I A N E T H K R L A L D R A S A N R R F A N Y S A E V T : 291
RCVMV : V E S P A A I Q P A E G L V R P T P E N Y V A F F T H K R L A L A N S D R S K R F A N N S S G V S : 271
GarCLV : V L N S A C V Q P L E G I I R V P T D E E T I A H M T N K R I A I D R N R R N G R F S S T N S L V T : 300
GarLV  : V T N K A A I Q P L E G L I R A P T D A E R I A F A T H K K L A L A K N S Q N S R Y A N T S A E V T : 280
CLV    : V Q N P A A I Q P L E G L L R I P T A E E K I A H A T N K R L A L D R N R R N A R F S S T D S L V T : 287

HeNNV : G G K F G R E L K R S Y R G S E S D - : 309
RCVMV : G G M F G C D N K V N F P N R P C - - : 288
GarCLV : G G M F G K D I K T N F N G S N N A D : 319
GarLV  : G G F F G C V E K N N F R E N R C - - : 297
CLV    : G G M Y G K D I K T N F N G S N N S D : 306

```

図 2.15 HeNNV を含む複数のカルライウイルスにコードされる CP アミノ酸配列のアライメントと予測される機能ドメインおよびモチーフ配列
CP 保存配列 (Conserved sequence) を橙色で示し、A/GFDF motif を青色で示し

```

                *           20           *           40           *
HeNNV : --MRIRDQKRALCSVFSFYCGNNRNYADVVG--LIMSFLSNAVGFSGTSN : 46
PopMV  : -MVNMRKVLALMQVFRERYDHKCDFNFCDIAVSIIVCRSELDFINEPGLSN : 49
GarLV  : MLIKQRTYRRLRLRAIFKLHTNKNCVDLIDI----IVSKIIVCDNAGASR-- : 44
CLV    : --MRERKLRKTLLEDLFKRFASVQHGHSDCVN---IIIIAKIKSGQPGESKY : 45
DVS    : MNAEQSAVCEIILISVFEAHGACVPLAICEN----ICRRAFPFPYGGGRSS : 46

```

```

basic motif      Zinc-finger motif
                60           *           80           *           100
HeNNV : YAKKRRARQVNRWCRCYRVIGGLCLPKNCNGVTCVPTSSNIASFILTGHR : 96
PopMV  : YAKKRRARQLGRCVRCFRVNPGFYFTKRCDGITCVPGISWNVDVEDYIKR : 99
GarLV  : YARARRAKSIGRCPRCFRCSPGFSTKNCDSKTCVPGISYNVKVKDFIVN : 94
CLV    : AQATYELSQYARCPRCARVSPGFYFTTRCDGKTCVSLVYQPDADLLEFIGI : 95
DVS    : YAKKRRALSIGRCHRCYRVWPPFYFTTRCDNKTCVSGISLNKKVQDFILW : 96

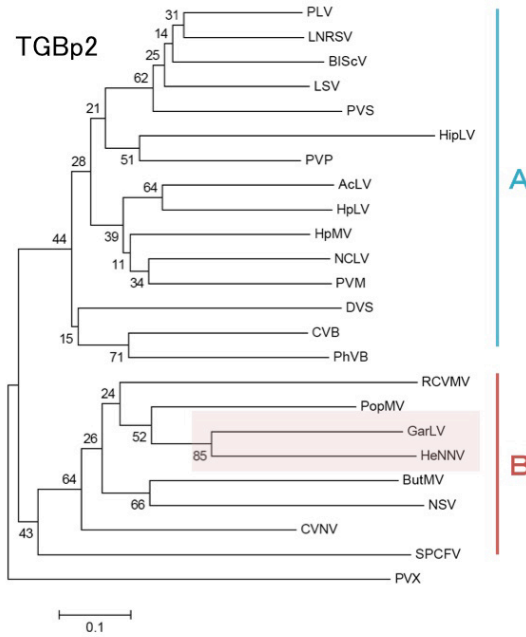
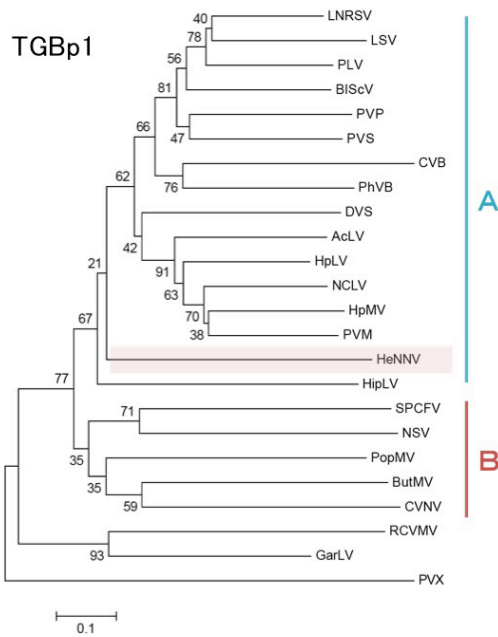
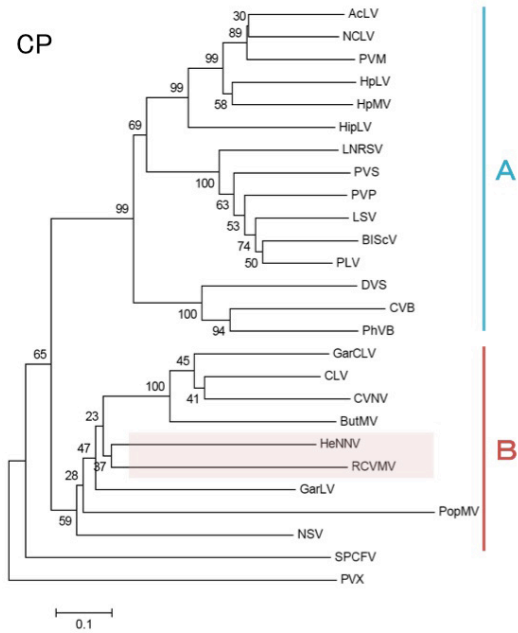
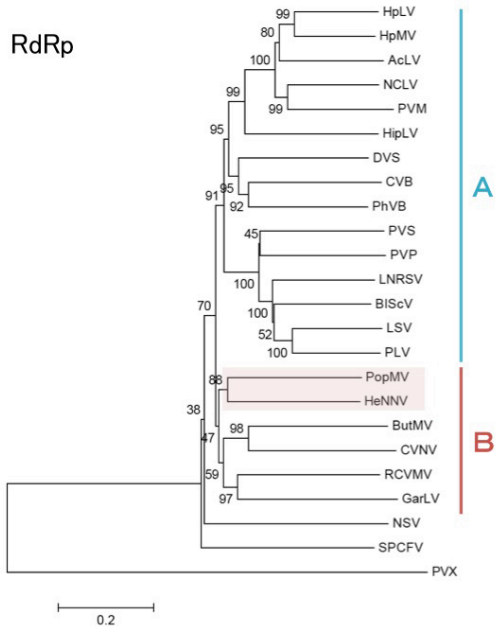
```

```

                *           120
HeNNV : VLDTRSRRSRCH----- : 108
PopMV  : GRVTGDRETPSTFHGYGYPVGHKT : 123
GarLV  : GVTM----- : 98
CLV    : DLCVRSK----- : 102
DVS    : GVTEVI PHPGFNF----- : 109

```

図 2.16 HeNNV を含む複数のカルラウイルスにコードされる NABP アミノ酸配列のアライメントと予測される機能ドメインおよびモチーフ配列
塩基性モチーフ (basic motif) を青色で、ジンクフィンガーモチーフ (zinc-finger motif) を橙色で示した。



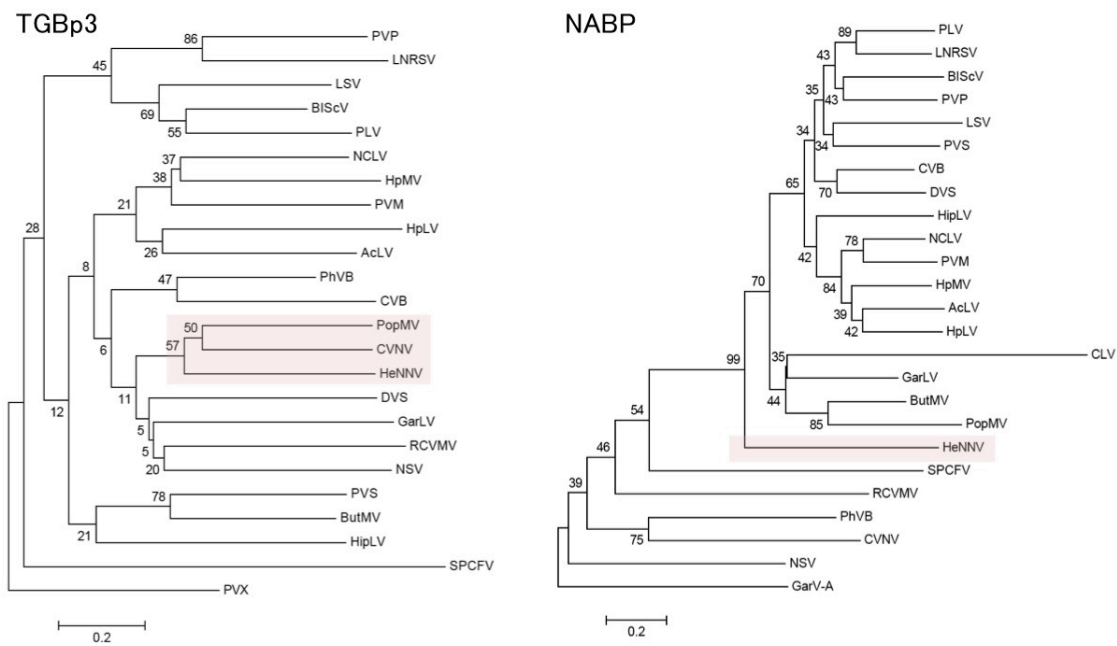


図 2.17 カルラウイルスの各 ORF アミノ酸配列に基づく系統樹

NABP 以外の系統樹については、アウトグループとしてポテックスウイルスの potato virus X (PVX) を用いた。NABP の系統樹については、アウトグループとしてアレキシウイルスの garlic virus A (GarV-A) を用いた。RdRp、CP、TGBp1、TGBp2 の系統樹では A、B の 2 つのグループに分けられた。

2.3.3 RT-LAMP 法による HeNNV 検出手法の確立

植物のウイルス病に対しては、弱毒ウイルス（いわゆる植物ワクチン）を用いる一部の例を除くと、防除に有効な薬剤が存在しないため、早期診断に基づく感染植物の速やかな除去が肝要である。ウイルスの早期診断には高感度な検出手法が必要であるが、HeNNV の検出手法はこれまで確立されていなかった。

特定のウイルスを検出するには RT-PCR 法が一般的であり、本研究でも縮重プライマーを設計し（表 2.2）、RT-PCR 法により HeNNV を検出したが（図 2.7）、RT-PCR 法は RNA 抽出などの煩雑な操作に時間がかかり、さらに PCR 反応、電気泳動にも時間を要する。そこで本研究では RT-LAMP 法を用いた迅速な HeNNV 検出手法を検討した。

2.3.3.1 RT-LAMP プライマーの設計

LAMP 法は、4 つのプライマー（プライマーセット）を用いて標的配列のほぼ全域にわたる 6 つの領域を認識することで、2 つのプライマーにより両端の 2 つの領域を認識する PCR 法と比較して極めて高い増幅特異性を有する。ここでは、日本分離株だけではなく他の分離株も検出できるように、配列の変異による擬陰性の可能性を低くするため分離株間で高い配列保存性を有する遺伝子領域を標的とした。日本分離株の全長配列をもとに Primer Explorer V4 を用いて 5 セットのプライマーセットが選別された。この中から米国分離株 G5、H6 分離株と保存性の高い領域（3'末端側、およそ 8,300 ~ 8,520 番目）に設計されたプライマーセット 2 セット（#1 および #2）を選び作成した（表 2.2、図 2.18）。

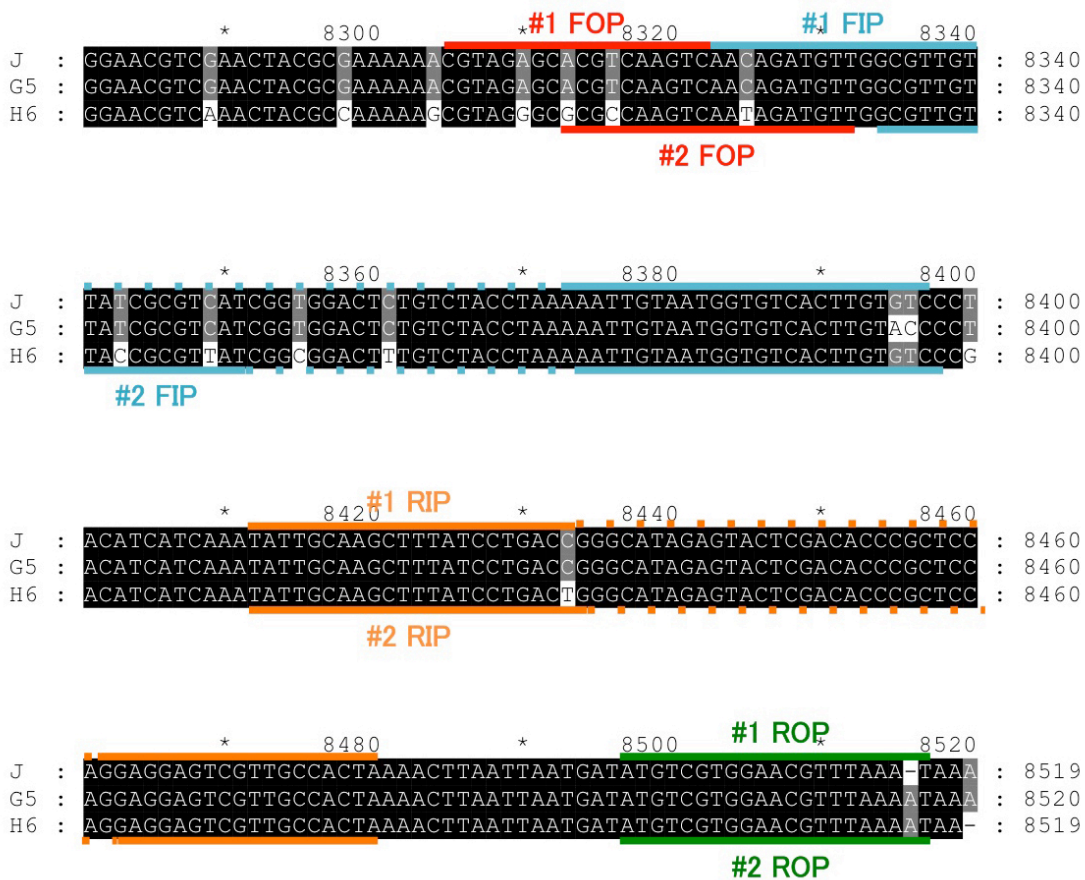


図 2.18 RT-LAMP プライマーセットの設計領域

ゲノムアライメントの上側にプライマーセット#1、下側にプライマーセット#2 の領域を示した。

2.3.3.2 リアルタイム RT-LAMP 反応

2セットのプライマーセットについてリアルタイム RT-LAMP 反応を行い、特異性を評価するため、増幅反応を 63°C で 30 分行った後、98°C から徐々に温度を下げて増幅産物の融点を解析することで増幅の特異性を確認した。感染植物より抽出した全 RNA をテンプレートにしたとき、いずれのプライマーセットでも特異的な増幅が検出された (図 2.19)。一方、非感染植物より抽出した全 RNA をテンプレートとしたとき、プライマーセット#1 では増幅が見られるものの融点の解析により非特異的な増幅産物であることがわかった。プライマーセット#2 では増幅は検出されなかった。これ以降は、より検出時間の短かったプライマーセット#2 を用いて実験を行った。

ダンベル構造の 5'末端側に相補的な配列を持つループプライマーを用いることで DNA 合成の

起点を増やし、検出時間を短縮することができる。Primer Explorer V4 を用いて設計したループプライマーを作成し、検出時間の短縮を試みた。その結果プライマーセットにリバースループプライマー (reverse loop primer, RLP)を加えた区において検出時間が短縮された (図 2.20)。ループプライマーを用いない区では 11 分 48 秒であったのに対し、RLP を用いた区では 8 分 18 秒であった。一方、FLP を用いた区ではループプライマーを用いない区と比べて検出時間が短縮されることはなかった。これらの結果より、今回作成したループプライマーのうち RLP のみが効果があることが示されたため、これ以降、RLP をプライマーセットに加えて実験を行った。

プライマーセット#2 に RLP を加えたプライマーセットを用いて検出時間が最も短くなる最適温度を検討した。その結果、65 ~ 67°C で反応した区で最も検出時間が短く、6 分 52 秒であった (図 2.21)。

さらに、RT-LAMP 反応に持ち込むまでの時間の短縮を試みた。通常はテンプレートに用いる RNA を得るために植物組織から CTAB 法などの RNA 抽出を行う必要があり、煩雑な作業と時間を要する。そこで、つまようじの先で検体植物組織を突き刺し、つまようじの先に付着した汁液を RT-LAMP 反応のテンプレートとして反応液に直接浸漬する簡易抽出法により RT-LAMP 反応を行った。反応温度 65°C で RT-LAMP 反応を行ったところ、11 分 35 秒で感染植物特異的に増幅が検出された (図 2.22)。

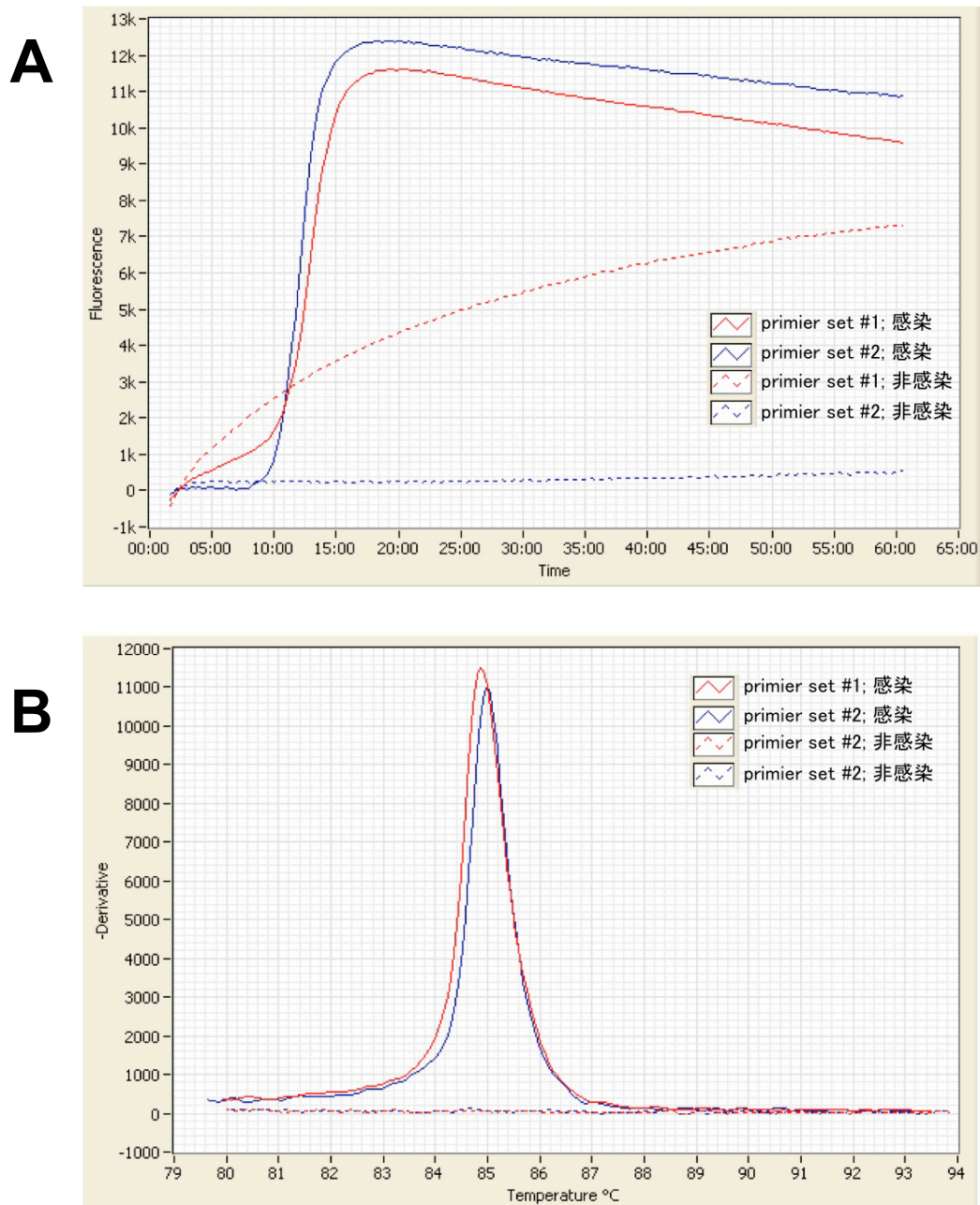


図 2.16 2 種類のプライマーセットによるリアルタイム RT-LAMP 反応

(A) 増幅曲線。縦軸は蛍光強度、横軸は反応時間を表す。両プライマーセットとも感染植物から抽出した全 RNA をテンプレートにしたときのみ増幅が検出された。

(B) 融点解析。横軸は温度、縦軸は増幅産物の蛍光強度の温度微分を表す。A で赤の破線が示す増幅は非特異的な反応であることが、増幅産物の融点解析により確認された。

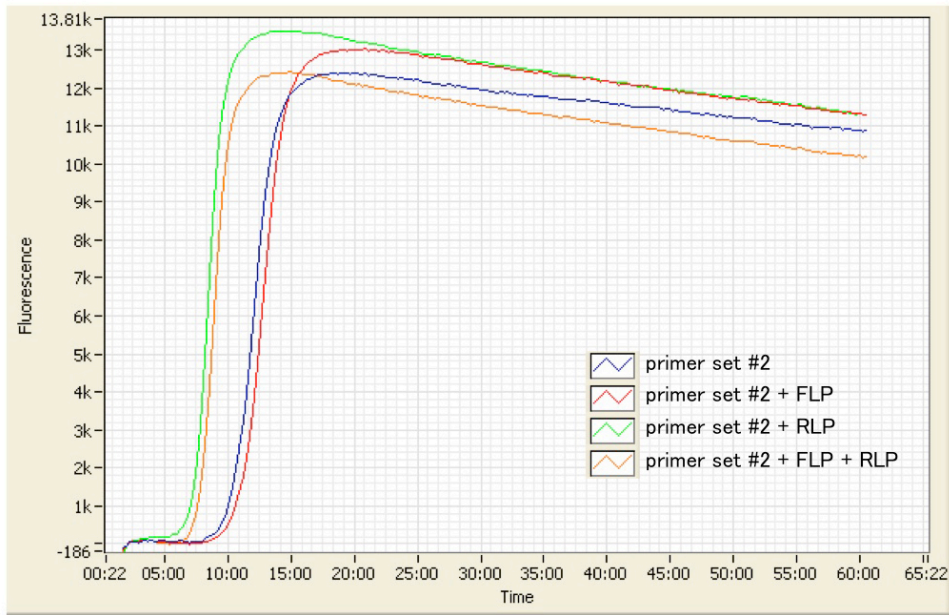


図 2.17 loop primer を用いた real-time RT-LAMP 反応

縦軸は蛍光強度、横軸は反応時間を表す。reverse loop primer (RLP) を適用したとき（緑の曲線）、検出時間が最も短くなった。

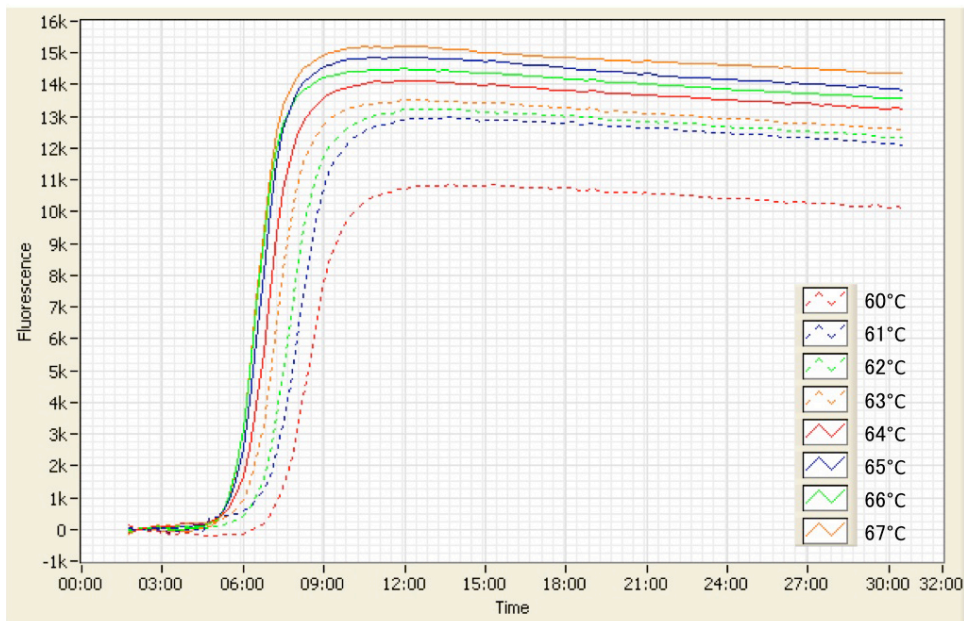


図 2.18 最適な温度条件の検討

縦軸は蛍光強度、横軸は反応時間を表す。65 ~ 67°C で最も検出時間が短くなった（青、緑、黄色の実線）。

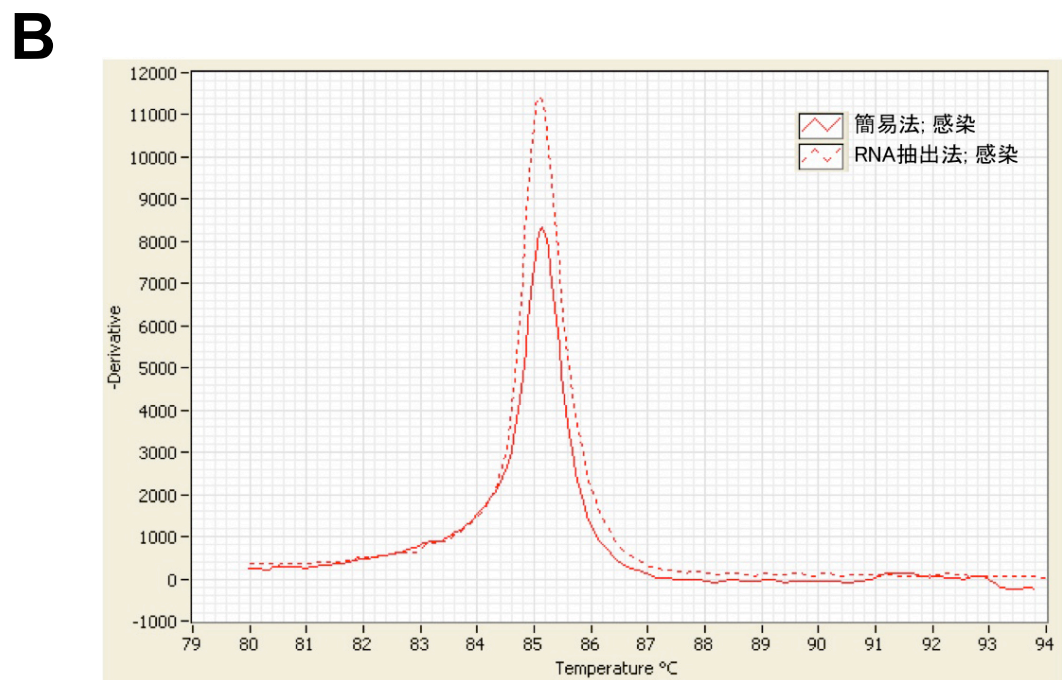
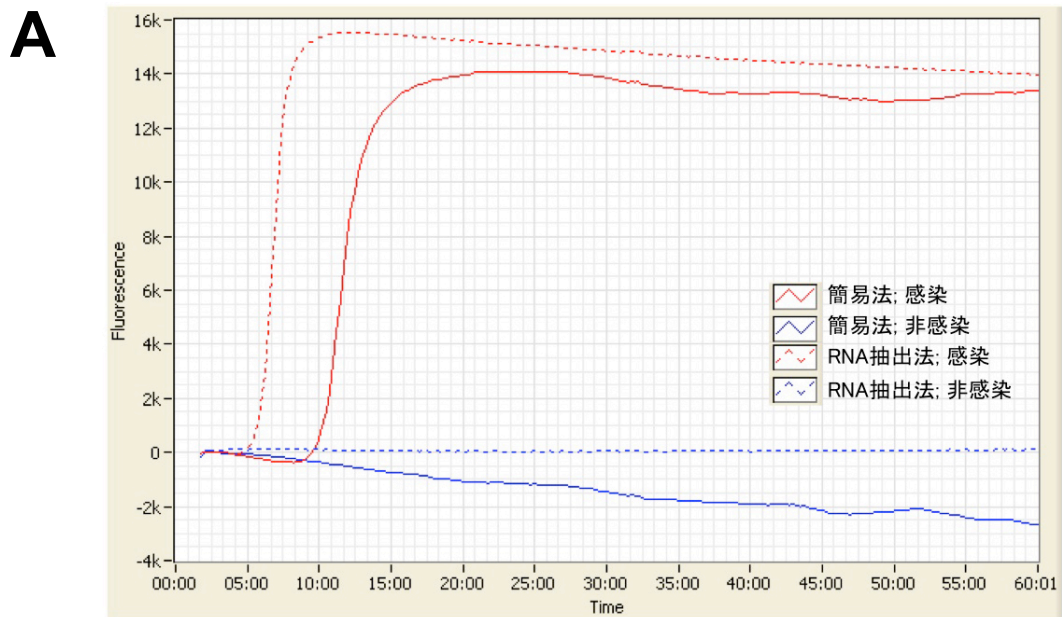


図 2.19 つまようじを用いた簡易法によるリアルタイム RT-LAMP 反応

(A) 増幅曲線。縦軸は蛍光強度、横軸は反応時間を表す。

(B) 融点解析。横軸は温度、縦軸は増幅産物の蛍光強度の温度微分を表す。つまようじを用いた簡易法でも特異的な増幅が確認された。

2.4 考察

全世界の理論上可能な作物生産高に対しておよそ 36%が植物病により損なわれているという試算がある（難波, 2008）。さらに、実際の生産量のうちおよそ半分は、植物病の防除によって損失を免れた結果であると推定されている（難波, 2008）。人口増加により将来の安定的な食糧供給が危ぶまれている中で、このような植物病による被害は無視できないものであり、より効果的な防除法を確立することが農業上の課題となっている。実際に野菜や果物などの病害対策は生産現場からの要請も多く農業政策上重要な課題として位置づけられることから、多くの研究者によって研究がなされ知見が蓄積してきている。これに対し生産量の少ないマイナークロップ (minor crop) に発生する植物病に関する研究はおろそかになりがちであり、防除対策を立てる際に参考にすべき知見も少ない。

本研究ではクリスマスローズというマイナークロップのウイルスについての研究を行った。クリスマスローズはアマチュアの園芸家が独自に交配・育種し、極めて多くの種類の花を作出して楽しんでいる。よって一つ一つの個体が園芸家にとって貴重な植物である。黒死病は一度罹病すると直ちに処分する他ないため、このような愛好家にとって長年問題となっていたウイルス病であった。しかし、あくまでマイナークロップであるため、その病原ウイルスについての研究はなされないままであった。本研究では、黒死病罹病クリスマスローズにカルラウイルスである HeNNV が感染していることを示した。また、HeNNV は世界的にもほとんど研究されていなかったため、全ゲノムを解読し、各 ORF の配列を詳細に解析した。ウイルスは自身のゲノムおよびコードされるタンパク質が感染過程のほとんどを規定していると言えるため、このようにウイルスの遺伝子構造を明らかにすることは、早期の診断・防除だけでなく基礎研究においても重要な基盤的知見となる。本研究では明らかにした HeNNV のゲノム配列をもとに RT-LAMP を用いた簡易診断技術を確立した。

2.4.1 クリスマスローズに発生した black death 症状の診断

本研究は、東京都の生産圃場においてクリスマスローズに発生した原因不明の病害について、東京大学植物病院への診断依頼が契機となり開始され、発生症状、電子顕微鏡観察による所見、分子生物学的診断により罹病株への helleborus net necrosis virus (HeNNV) の感染を確認した。

1990 年代初頭より、black death 病は欧州諸国のクリスマスローズ園芸家や生産者を悩ませていた。HeNNV は海外においてクリスマスローズ black death 病から分離されることから、この症状との因果関係が示唆されている (Eastwell et al., 2009, Liefting et al., 2010)。本研究で

初めて我が国においても black death 病の症状を示すクリスマスローズから HeNNV が分離された。

ある微生物が特定の病害の原因であることを証明するためには通常コッホの原則を満たさなくてはならない。本研究においても HeNNV が本症状の原因であることを証明するために、HeNNV 感染植物の汁液をクリスマスローズに機械的に接種したが、HeNNV の感染は確認されず病徴は再現されなかった。よって、本症状の原因を HeNNV と断定することはできなかった。しかし、本症状が海外で報告されている black death 病の症状と酷似していること、海外で報告されている black death 病から HeNNV が分離されるという知見から本症状を black death 病と診断した。本病害は国内初報告となるので、病名として「クリスマスローズ黒死病」を提案した。

植物ウイルスの中には汁液接種の困難なウイルスが存在する。HeNNV に関しても諸外国で汁液接種に成功したという報告が未だなされていないことを考えると、汁液接種の困難なウイルスであると判断される。

今後、本病の防除対策構築に向け、HeNNV が黒死病を単独で引き起こしうる病原体であるか、もしくは他のウイルスとの重複感染が必要であるのかを判定しなくてはならない。まず、汁液接種に代わる方法として接ぎ木接種またはカルラウイルスの一般的な媒介生物であるアブラムシを用いた吸汁接種を行い、病原性の再現および HeNNV の再分離を試みる必要がある。さらに、精製したウイルス粒子の機械的接種、あるいは全長ゲノム RNA を鋳型とした cDNA クローンを作成し、*in vitro* 転写されたウイルスゲノム RNA の機械的接種や、アグロインフィルトレーション法による接種によって病原性の再現および HeNNV の再分離を行い、HeNNV が唯一の病原体であることを証明する必要がある。HeNNV 単独で病原性がない場合には重複感染の可能性を検討するため、罹病組織の電子顕微鏡観察により、HeNNV 以外の病原体が見られない調べる必要がある。また、ウイルスの複製中間体である dsRNA を抽出し、配列を決定することにより他のウイルス感染の有無を調べることも必要である。さらに、宿主範囲の探索、媒介生物の特定を行なうことで、防除戦略を構築することができると考えられる。

2.4.2 HeNNV ゲノム解析

HeNNV の全長塩基配列は米国の G5、H6 分離株で報告されているが、ゲノム構造の詳細な解析はこれまでなされていなかった。本研究では J 分離株の全長塩基配列を決定し、まず、他の HeNNV 分離株間での系統解析を行った。その結果、J 分離株は G5 分離株と塩基配列で 99% の配列一致度を示し、最も近縁であった。このことから、J 分離株の侵入拡散経路について 3 つの仮説が考えられる。すなわち、J 分離株が日本から米国に渡った可能性、あるいは逆に米国から日本に渡った可能性、あるいは他の国から日本と米国に渡った可能性があるが、どの可能性

が最も確からしいかは現時点の知見では判断できない。しかし、配列情報のある HeNNV 分離株は本分離株でいまだ 5 分離株目であり、今後欧州の分離株などの塩基配列が解読されれば、本ウイルスの侵入経路が明らかになることが期待され、今後の拡散防止対策の構築にとって非常に重要な知見となると考えられる。

HeNNV G5 分離株の全長塩基配列から HeNNV ゲノム上には、他のカルラウイルスとの比較類推から 6 つの ORF が存在し、RdRp、TGBp1、2、3、CP、NABP がコードされていると推定されていた (Eastwell et al., 2009)。本研究では J 分離株の配列を用いて機能ドメインおよびモチーフ配列の解析をおこない、それぞれの ORF にコードされているタンパク質のアミノ酸配列から機能を検証した結果、RdRp、TGBp1、2、3、CP、NABP がコードされていることが示唆された。

また、HeNNV はカルラウイルス属に属するが、他のカルラウイルスとの系統関係は詳細に解析されていなかった。ウイルスの分子系統樹はウイルスの進化の過程、宿主や媒介生物との関係を反映することがあり、そのウイルスの性状に迫る上で重要な知見となり得る。

一般的にウイルスの感染に最も重要な RdRp に基づいた系統関係はウイルスの進化の過程を反映すると考えられている (Martelli et al., 2007)。RdRp による系統樹は PopMV を含むグループ (A グループ) と、PhVB を含むグループ (B グループ) の 2 つのグループに大きく分かれる特徴 (ブートストラップ値 91) が認められた (図 2.17)。このグループは構成ウイルスをほとんど変えることなく TGBp1 (ブートストラップ値 67)、TGBp2 (ブートストラップ値 44)、CP (ブートストラップ値 99) による系統樹でも認められた。一方で、TGBp3、NABP による系統樹の樹形は RdRp による系統樹の樹形と著しく異なっていた。TGBp3 についてはタンパク質の分子量が小さく、保存配列以外の領域での相同性が著しく低いため他の系統樹と異なる樹形になったと考えられる。

HeNNV は RdRp、TGBp2、CP による系統樹においては PopMV を含むグループ (PopMV グループ) に属した。しかし、TGBp1 による系統樹においては、HeNNV 以外の PopMV グループウイルスの TGBp1 は RdRp の系統樹と同様のグループを形成する一方で、HeNNV の TGBp1 のみが PhVB を含むグループに属した。このことから、PopMV グループの中で HeNNV の TGBp1 のみが他のウイルスとは異なる選択圧を受けていたと考えられる。ベータフレキシウイルス科に属する grapevine virus A をはじめとした多くのウイルスで NABP は RNA サイレンシングサブレッサーとして機能することが報告されていたが (Zhou, 2006、Ghazala, 2008、Alvarado, 2009)、最近カルラウイルス属の PVM でも NABP が RNA サイレンシングサブレッサー能をもつことが報告された (Senshu et al., 2011)。また、PVM においては NABP と共に、

TGBp1 も RNA サイレンシングサプレッサーとして機能することが報告された (Senshu et al., 2011)。よって HeNNV の TGBp1 も RNA サイレンシングサプレッサーの機能を持つ可能性がある。NABP の系統樹を見ると HeNNV はカルラウイルスのメジャーグループに属すものの、他のウイルスとクラスターを形成しないことがわかる (図 2.17)。このことから、HeNNV では NABP もメジャーグループ内の他のウイルスとは異なる選択圧を受けたと考えられる。仮に、HeNNV の TGBp1 および NABP が RNA サイレンシングサプレッサーであるとする、両者が特異な選択圧を受けていることは興味深い。両タンパク質の宿主との相互作用における役割を解析することで、他のカルラウイルスとは異なる感染機構が見出される可能性がある。

2.4.3 HeNNV の早期検出手法の確立

植物のウイルス病に対しては、防除に用いる薬剤は無く、早期診断と感染植物の速やかな除去が植物ウイルス病防除の要となる。黒死病の症状は菌類による病害や生理障害と見分けが付きにくい、生産者や園芸家にとっては適切な対処法を判断することが難しい。もし、ウイルスが感染しているにも関わらず、ウイルス感染の判断に時間を費やし、適切な処置が施されなければ、その間にウイルス感染は拡大し得る。また、カルラウイルスはアブラムシ伝搬によって他のウイルスと共存し、組み換えなどによって 2 種類の RNA サイレンシングサプレッサーを巧みに駆使することで宿主に適応する可能性もあり、新たな宿主の獲得を防止するため早期診断・除去が不可欠であると考えられる。

本研究では HeNNV を簡易・高感度に検出し、感染植物をただちに除去することが本病害の拡大および新規ウイルス病の発生を阻止する上で重要であると考え、RT-LAMP 法を用いた HeNNV 検出手法を確立した。特定のウイルスを検出するには RT-PCR 法が一般的であるが、RNA 抽出などの煩雑な操作に時間がかかり、さらに PCR 反応、電気泳動にも時間を要する。本研究で確立した検出法では RNA 抽出の過程を経ることなく、検定植物につまようじを突き刺し、先端に付着した汁液により LAMP 反応を行うことが可能である。さらに、PCR と比べて増幅効率のよい LAMP 反応にさらに増幅の起点を増やすループプライマーを加えることで、リアルタイム LAMP 装置を用いて 15 分以内に LAMP 反応の増幅産物を検出することが可能になった (図 2.22)。本研究で確立した LAMP 法を用いた診断法により、HeNNV 感染の早期検出が可能になると考えられた。本法が HeNNV 感染拡大の抑制や新たなウイルス病発生抑制の一端を担うことを期待したい。

第3章 ポテックスウイルスに対する抵抗性遺伝子 JAX1 に関する研究

3.1 レクチン

レクチンは可逆的に糖に結合するタンパク質の総称である (Sharon and Lis, 1989)。ほぼ全ての生物がレクチンを有しているが、初めて同定されたレクチンはヒトの赤血球を凝集させる植物タンパク質であった (Van Damme et al., 1998)。レクチンは特定の単糖もしくはオリゴ糖を認識することから自己-非自己認識に関わる分子であると考えられており、病原体の認識に関わっている可能性が示唆されている。実際、フィコリンやマンノース結合レクチンを含むいくつかの動物レクチンは病原体を認識し、補体系 (脊椎動物、無脊椎動物が有する自然免疫系の一つ) を活性化する (Fujita, 2002)。さらに、C型レクチン受容体 (c-type lectin receptors; CLR) は動物が有する4つのPRR (Toll/interleukin-1受容体、NOD様受容体、RIG1様受容体、CLR) のうちの一つであり、病原体認識、特に菌類の認識を担う受容体である (Pålsson-McDermott and O'Neill, 2007、Willment and Brown, 2008)。植物レクチンは多様な活性を有することが示されており、例えば動物細胞において細胞表面の糖を認識することで抗微生物、抗ガン活性を示すが、植物における役割の詳細はほとんど分かっていない (Sharon and Lis, 1989、Peumans and Van Damme, 1995、Cowan, 1999、Van Damme et al., 2004、Lam and Ng, 2011)。ほとんどの植物レクチンは外生的な糖には結合するが植物内生の糖とは結合しないことから、防御応答に関わっている可能性がある (Van Damme et al., 2004)。多くの植物レクチンが様々な生物ストレス、非生物ストレスによって誘導され、抗細菌、抗菌類、抗昆虫活性を示すことから植物レクチンが防御応答に関わっていることが示唆されている (Chrispeels and Raikhel, 1991、Peumans and Van Damme, 1995、Van Damme et al., 2004)。

また、植物レクチンは病原微生物の認識に関わっている可能性もある。ダイズ (*Glycine max*) のレクチン、 β -グルカン結合タンパク質は *Phytophthora sojae* のPAMPであると考えられている (β -グルカンと強く相互作用することが示されている (Mithöfer et al., 2000、Fliegmann et al., 2004))。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) やイネ (*Oryza sativa*) においては糸状菌に対するPRRがキチンと結合するLysMドメインを有するレクチンであることが示されている (Miya et al., 2007、Shimizu et al., 2010)。

さらに、シロイヌナズナの *RESTRICTED TEV MOVEMENT1 (RTM1)* はジャカリンレクチンをコードする遺伝子であり、tobacco etch virus (TEV) の長距離移行を阻害する (Chisholm et al., 2000、図 3.1)。本研究では、ポテックスウイルスに対する抵抗性を付与するジャカリンレク

チン遺伝子 *JAX1* を同定した。*JAX1* 抵抗性は植物ウイルス感染の初期段階を阻害しており、*RTM1* 抵抗性とその機構が異なることが示唆された。このようなレクチン遺伝子が同定されたことから、植物-ウイルス間の相互作用においてレクチン抵抗性 (lectin-mediated resistance; LMR) が重要な役割を持っている可能性が示唆された。

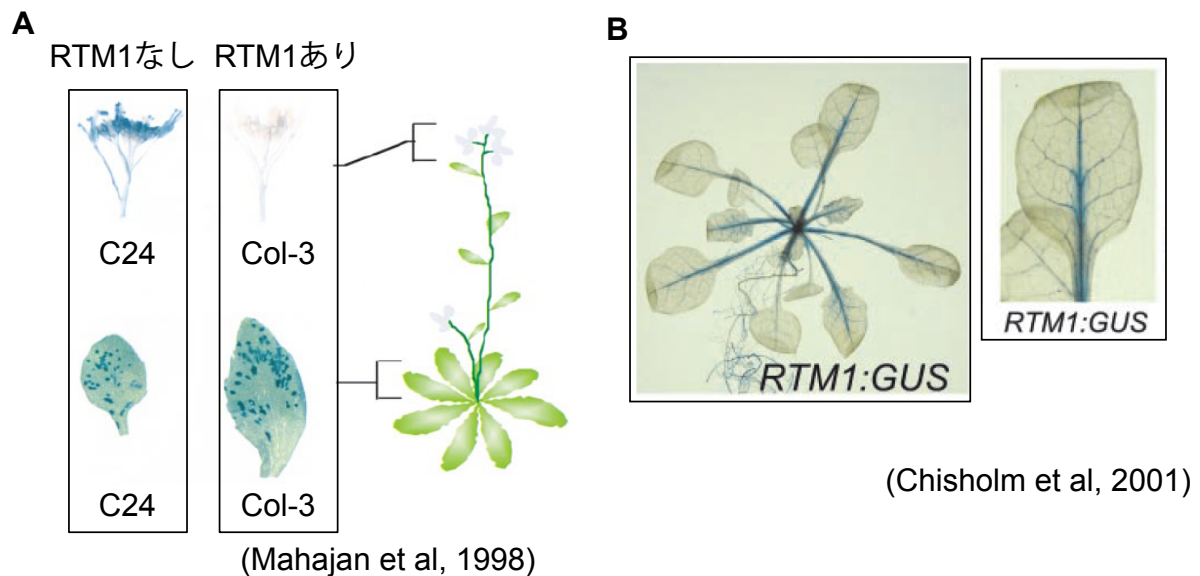


図 3.1 *RTM1* 抵抗性

(A) TEV 感受性エコタイプおよび抵抗性エコタイプにおける GUS 発現 TEV の感染。*Arabidopsis thaliana* の C24 エコタイプは *RTM1* を有しておらず、TEV が全身感染する。青い染色は GUS による発色で、TEV の感染を示す。Col-3 エコタイプは *RTM1* を有しており、TEV は接種葉にのみ感染する。C24 と Col-3 で接種葉での蓄積には差がないことから、*RTM1* 抵抗性はウイルスの長距離移行を阻害すると考えられている。

(B) プロモーター:レポーター解析による *RTM1* の発現解析。*RTM1* のネイティブプロモーターにより GUS を発現し、GUS を染色している。*RTM1* は維管束組織で発現していると考えられる。

3.2 材料と方法

3.2.1 抵抗性エコタイプのスクリーニング

3.2.1.1 植物

Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC, Ohio State University, Columbus, OH) よりシロイヌナズナの 45 種類のエコタイプの種子を入手した。シロイヌナズナはグロースチャンバーを用い、明期 16 時間、暗期 8 時間、23°C の条件で生育させた。*Nicotiana benthamiana* は明期 16 時間、暗期 8 時間、25°C の条件で生育させた。

3.2.1.2 ウイルスとスクリーニングのためのウイルス接種

本研究では plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) に対する抵抗性エコタイプを探索した。PIAMV はアルファフレキシウイルス科ポテックスウイルス属に属するプラス 1 本鎖 RNA をゲノムに持つウイルスである。ポテックスウイルスの多くは主にナス科植物を宿主としアブラナ科植物には感染しないが、PIAMV はアブラナ科植物であるシロイヌナズナのエコタイプ Col-0 に感染する (Minato et al. 2014)。これまでに緑色蛍光タンパク質 green fluorescent protein (GFP) で標識した PIAMV の感染性バイナリーベクター pPIAMV-GFP が作製されており (図 3.2A、Minato et al. 2014)、これを形質転換したアグロバクテリウムをシロイヌナズナの葉に注入することでウイルスを接種した (アグロインフィルトレーション)。植物に感染したウイルスは GFP 蛍光を発するため、UV 照射により目視でウイルスの感染有無を観察できる。シロイヌナズナへの PIAMV-GFP の接種は播種 2 週間後のロゼット葉にアグロインフィルトレーション法で行った。

3.2.1.3 アグロインフィルトレーション法

ウイルスの感染性 cDNA 配列を有するバイナリーベクターを freeze-thaw 法 (An et al., 1988) によりアグロバクテリウム EHA105 株へ形質転換した。形質転換したアグロバクテリウムを LB/Kan 液体培地 (1,000 ml あたり Bacto-tryptone 10 g、Yeast extract 5 g、NaCl 10g、kanamycine 50 mg) 上で 28°C で 12-20 時間振盪培養し、3,000 ×g、室温で 15 分遠心して集菌した。上清を取り除き、インフィルトレーションバッファー (10 mM MgCl₂、10 mM MES、150 μM acetosyringone、pH 5.7) を加え懸濁した。OD₆₀₀=1.0 となるようにインフィルトレーションバッファーを加え、室温、遮光下で 3 時間静置した。この菌液を 1 ml のシリンジを用いてシロイヌナズナのロゼット葉の背軸側に注入した。

3.2.1.4 スクリーニング

1次スクリーニングとして、1エコタイプにつき2個体にPIAMV-GFPを接種し、接種20日後にGFP蛍光の有無を観察した。植物体全身で蛍光が観察されたエコタイプを感受性エコタイプとした(図3.2B)。接種葉でのみ蛍光が観察されたエコタイプおよび全く蛍光が観察されないエコタイプを抵抗性エコタイプとし2次スクリーニングに供試した(図3.2C)。2次スクリーニングでは1エコタイプにつき7個体にPIAMV-GFPを接種し、同様にGFP蛍光の有無を観察し抵抗性エコタイプを選抜した(図3.2D)。上位葉で蛍光が観察されなかったエコタイプに対してはGFPのベクターからの抜け落ちを考慮し、RT-PCRによっても上位葉からPIAMVが検出されないことを確かめた。シロイヌナズナからのRNA抽出にはQiagen社のRNeasy plant mini kitを用いた。

3.2.1.5 RT-PCR

RNeasy plant mini kitにより抽出した全RNAを鋳型にcDNAを合成した。cDNA合成にはReverse Transcriptase XL (AMV) (TaKaRa)を用いた。約500 ngのRNAにOligo dTプライマー1 μ M、MgCl₂ 5 mM、dNTP Mixture 1mM、Ribonuclease Inhibitor (TaKaRa) 0.8 U/ μ l、10 \times RNA PCR Buffer 1.5 μ l、5U/ μ lのAMV Reverse Transcriptaseを0.2 μ lを加え、RNase Free DWで最終容量を15 μ lとした。逆転写反応は42 $^{\circ}$ C 30分、99 $^{\circ}$ C 5分とし、その後氷冷した。このRT産物を鋳型にPCRを行った。PCRにはKOD-Plus-(TOYOBO)を用いた。RT産物2.5 μ lにプライマー各0.3 μ M、10 \times PCR Buffer for KOD-Plus- 5 μ l、dNTP Mixture 0.2 mM、MgSO₄ 1 mM、1U/ μ lのKOD-Plus-を1 μ l加え、DWで最終容量50 μ lとした。94 $^{\circ}$ C 2分の後、PCR反応を40サイクル(熱変性94 $^{\circ}$ C 15秒、アニーリング55 $^{\circ}$ C 30秒、伸長反応68 $^{\circ}$ C 60秒/kbを1サイクルとする)行った。PIAMV検出プライマーは表3.1に示した。

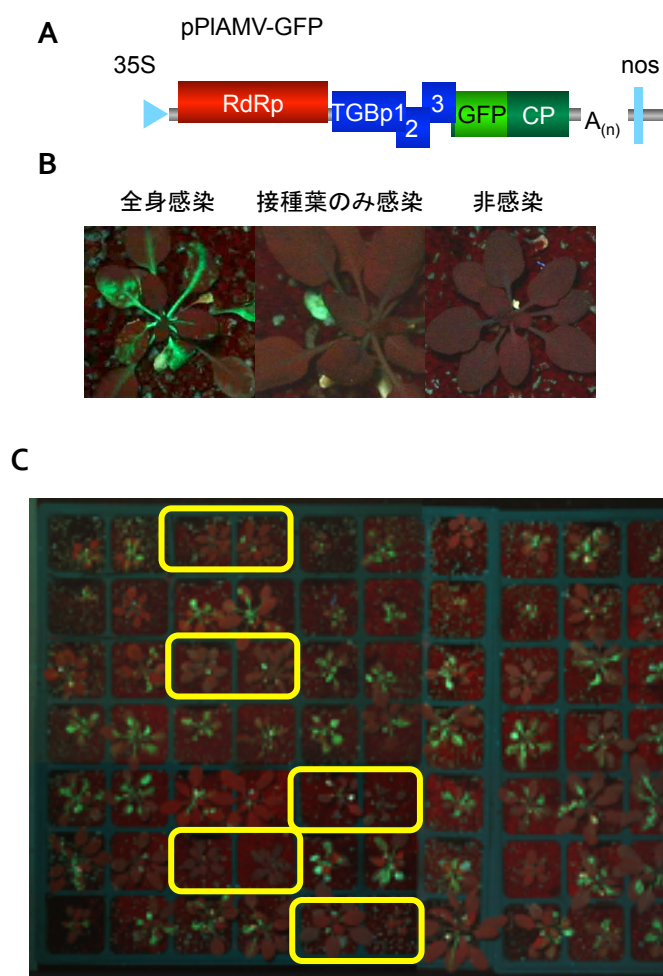
3.2.1.6 機械的接種

アグロインフィルトレーション法は接種圧が高く、蓄積量の微細な差異を判別するには不向きな接種法である。そこで、抵抗性エコタイプの抵抗性を詳細に解析するためにPIAMV-GFPの機械的接種を行った。機械的接種の接種源としてPIAMV-GFP感染*N. benthamiana*の葉を用いた。PIAMV-GFP感染葉0.1 g当たり1 mlの0.1 Mリン酸バッファー(pH 7.0)中で摩砕し粗汁液を得た。シロイヌナズナのロゼット葉にカーボランダムをかけ、綿棒を用いて粗汁液をロゼット葉に擦り付けた。接種3日後および4日後に接種葉をUV照射下で観察し、ウイルス感染による蛍光斑の数とサイズを計測した。また、接種3~5日後にかけて蛍光斑の広がり速度を調べた。また、接種葉でのウイルス蓄積量を比べるためにノーザンブロット解析を行った。

3.2.1.7 ノーザンブロット解析

ノーザンブロット解析にはRoche Diagnostics社のdigoxigenin (DIG) システムを用いた。ノ

一ザンブロットは DIG アプリケーションマニュアルに従った。接種 4 日後の接種葉および接種 20 日後の接種葉より抽出した全 RNA を 95°C で 5 分間変性処理し、ホルムアルデヒド変性アガロースゲル (1.2%アガロース、1×MOPS、5%ホルムアルデヒド) を用いて分離した。泳動後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 LAS-4000 mini (Fujifilm) を用いて撮影した。アガロースゲルで分離した RNA を、Turboblotter システム (Schleicher&Schuell) を用いて Nyron Membrane, positively charged (Roche Diagnostics) に転写した。転写後のメンブレンを DIG Wash and Block Buffer Set (Roche Diagnostics) を用いて洗浄し、DIG ラベルした RNA プローブをハイブリダイゼーションした。その後、10,000 倍希釈した Anti-Digoxigenin-Fab fragment 抗体を用いて抗体反応し、CDP star (New England Biolab) を用いて検出した。検出に用いた RNA プローブは、PIAMV の CP 遺伝子領域全体を標的に、DIG Northern Starter Kit (Roche Diagnostics) を用いて作成した。CDP-star による化学発光の検出には LAS-4000 mini (Fujifilm) を用いた。



D

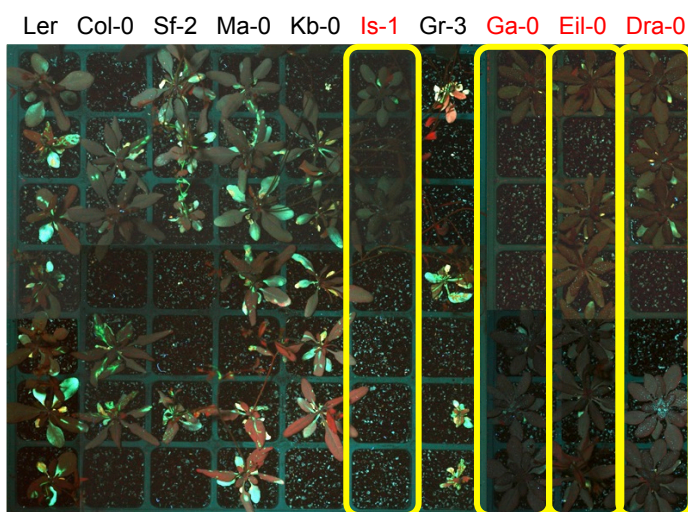


図 3.2 スクリーニングに用いたウイルスの感染性バイナリーベクターと PIAMV 抵抗性エコタイプ
プスクリーニングの実験例

(A) 抵抗性エコタイプのスクリーニングに用いた PIAMV-GFP のゲノム構造の模式図。GFP は CP との融合タンパク質として CP サブゲノムプロモーターにより発現される。PIAMV-GFP 感染性 cDNA は 35S プロモーターの制御下で発現される。接種はアグロインフィルトレーション法により行った。

(B) PIAMV-GFP 感染による表現型。アグロインフィルトレーション法により PIAMV-GFP をシロイヌナズナのエコタイプに接種し、接種 20 日後に GFP 蛍光を UV 照射下で観察した。全身感染、接種葉のみ感染、非感染の 3 つの表現型が観察された。全身感染した植物を感受性、接種葉のみの感染および非感染の植物を抵抗性エコタイプとした。

(C) 1 次スクリーニングの例。各エコタイプにつき 2 個体に PIAMV-GFP を接種した。黄色で囲んだエコタイプは抵抗性エコタイプと推定されたものを示す。

(D) 2 次スクリーニングの例。1 次スクリーニングで選抜したエコタイプを各 7 個体ずつ PIAMV-GFP を接種した。赤字でラベルし、黄色で囲んだエコタイプは選抜された抵抗性エコタイプを示す。

表 3.1 本研究で用いたプライマー

プライマー名	配列 (5' → 3')
JAX1-F	TTGGATCCCTGGAAGATCCATCGGGTAC
JAX1-R	TTCTCGAGGAATTCTTACTTAGCAGGAGA AAG CGG
JAX1UP-F	AAGTCGACGGATCCGATTGATGGGTTCCATGGAAA
JAX1UP-R	CTGATGGTGTAGCCATAGAATTGG
RTM1-F	CCGTCGACATGAAGATAGGACCTGTAGGGAAGCATGA
RTM1-R	CACTCGAGTCAGCCCAGTACAATTTTTGACTCTGTTTCC
AV3-F ^a	CATGGAAATTAGTTATATAGTAGAT
AV3-R ^a	TAAGAGCCCCGATGGCG
CMV-F ^b	TGGACAAATCTGAATCAACCAG
CMV-R ^b	CAGACTGGGAGCACTCCAG
PVX-F ^c	TTTCAATTGCATCAGCACCAGCTAGCACAAACACAG
PVX-R ^c	AAAAACTAGTTGGTGGTGGTAGAGTGACAAC
PVY-F ^d	TGCCAAAGCTTGAACCTGG
PVY-R ^d	CCTCCTTCTCTGAAAGGTGAT
RaMV-F ^e	TGAATTCCATATGTGCTACAACAGTGGAGTACG
RaMV-R ^e	ATTCTCGAGAGGCGAAGTGGCATCAACATC
TMVW-F ^f	TGTCATACAACATCACGAACTCG
TMVW-R ^f	TATTTAGCCGGCGCAGTAG
TRV1F ^g	TTGATCAACTCGTTGTTCCGGTCC
TRV1R ^g	AGCTCTCTGTGCCTTCTTCC
TuMV-F ^h	GGAATTCCCGATCAAACCG
TuMV-R ^h	TCACCACATGCGCTAACAC
WCIMV-F ⁱ	AACATATGGCAACCACCACAGCAAC
WCIMV-R ⁱ	AACTCGAGCTGGGGATAGGTAATAAGGG
RaMV-F ^j	CTGCCAATGAAACGGAGG
RaMV-R ^j	CCCCTGCCATTACCTTTGTG
AtActin-F ^k	GGCATCACACTTCTTCTACAA
AtActin-R ^k	CACTGAGCACAATGTT
AtPR1-F ^l	AACTTAGAAAAATGAATTTTACT
AtPR1-R ^l	AAAGACATTAACATAATAATTAATTAT
AT1G20726301F ^m	AGTATCTTCTTTCTTCTCCA
AT1G20727800R ^m	TGAATCTCTACAATTGCTCG
AT1G21387101F ⁿ	TTGTCTGCAGCTCCACTTTA
AT1G21388400R ⁿ	TCAGTTCTCACTTGGTTCTT
AT1G21493416F ^o	CCATCAATAGTGACTGATCCACTCTG
AT1G21495195R ^o	GGTGAAGATACTGCAAGAGGTATGTG
AT1G21520196F ^p	AGCTTACGGACCCGTGATCTTTGT
AT1G21521340R ^p	CTGTTCTGGTCTGGTTGTCTGAAT
AT1G21609001F ^q	TTCCAATATTATTCTTTTCTTC
AT1G21610400R ^q	TTTTGTGTGTAACAATTCTATG
AT1G22051301F ^r	CGATCATCGTAGTTTCTATTTTC
AT1G22053100R ^r	TGAATGTATCTTTGCTGATTG

^{a-i} AV3^a、CMV^b、PVX^c、PVY^d、RaMV^e、TMV^f、TRV^g、TuMV^h および WCIMVⁱ の RT-PCR に用いたプライマー

^j RaMV のリアルタイム RT-PCR に用いたプライマー

^k シロイヌナズナのアクチンのリアルタイム RT-PCR に用いたプライマー

^l PR-1 の RT-PCR に用いたプライマー

^{m-r} SNP20.7^m、SNP21.3ⁿ、SNP21.4^o、SNP21.5^p、SNP21.6^q および SNP22.0^r のプライマー

3.2.2 抵抗性遺伝子のマッピングおよびクローニング

3.2.2.1 マッピング

抵抗性遺伝子のラフマッピングは、シロイヌナズナの 5 つの染色体を網羅する 23 の simple sequence length polymorphism (SSLP) マーカーを用いた連鎖解析により行った。抵抗性エコタイプとして選抜されたエコタイプ Bay-0 を感受性エコタイプ Col-0 と交配し作出した F1 植物をさらに自殖させ F2 植物を得た。PIAMV-GFP が全身感染する F2 個体 1500 からゲノム DNA を抽出した。DNA の抽出は Qiagen 社の DNeasy plant mini kit を用い製品マニュアルに従って行った。ファインマッピングは、Col-0 の配列か Bay-0 の配列かを判別できる 6 つの single nucleotide polymorphism (SNP) マーカーを用いて河内らの手法に従って行った (Kawachi et al. 2006)。まず、SSLP マーカーの *ciw1* に隣接する SNP マーカーである SNP20.7 および nF5I14 に隣接する SNP22.0 を用いて F2 植物を解析した。これら 2 つの SNP マーカー間で組換えの起こった植物個体に対し、さらに内側に 2 つの SNP マーカー SNP21.3 および SNP21.6 を設計し遺伝子型を解析した。この過程をもう一度、2 つの SNP マーカー SNP21.4 および SNP21.5 を用いて行うことで抵抗性遺伝子座を 130 kb に絞った。SSLP マーカーのプライマー情報は The Arabidopsis Information Resource (TAIR) database (<http://www.Arabidopsis.org/>) から取得した。SNP マーカーのプライマー配列は表 3.1 に示した。

3.2.2.2 JAX1 配列解析

Bay-0 および Col-0 より抽出した全 DNA に対し、JAX1-F および JAX1-R プライマー (表 3.1) を用いて PCR をすることでそれぞれの *JAX1* のゲノム配列を増幅した。また、Bay-0 および Col-0 より抽出した全 RNA に対し、同プライマーセットを用いて RT-PCR することでそれぞれの *JAX1* の cDNA 配列を増幅した。3 増幅断片について配列を解析し、Bay-0 と Col-0 の間で配列比較をした。RT-PCR の方法は 3.2.1.5 に記した。PCR には KOD -plus- を用いた。PCR の方法は 3.3.1 に記した。配列解析の方法は 2.2.6 に記した。

3.2.2.3 抵抗性の相補実験に用いたコンストラクト

・ pJAX1-JAX1

推定 *JAX1* プロモーター領域および *JAX1* 配列を含む約 3.5 kb の断片を JAX1UP-F と JAX1-R プライマーを用いて Bay-0 より抽出した DNA から PCR により増幅した。PCR の方法は 3.3.1 に記した。増幅産物をバイナリーベクター pCAMBIA1301 に同ベクター上の 35S プロモーター配列および GUS 遺伝子配列と置換する形で組換え、pJAX1-JAX1 を作出した。

・ p35S-JAX1

上述の通り増幅した JAX1 の cDNA を pENTR 1A にクローニングし、pENTR-JAX1 を作出した。これを LR クロナーゼによる Gateway technology (Invitrogen) を用いてバイナリーベクター pEarleyGate100 に組換えた (Earley et al., 2006)。このベクター上には 35S プロモーターが搭載されている。作出したコンストラクトを p35S-JAX1 とした。

3.2.2.4 シロイヌナズナの形質転換

シロイヌナズナのエコタイプ Col-0 への形質転換は floral dip 法を用いた (Clough and Bent, 1998)。pJAX1-JAX1 および p35S-JAX1 を保持するアグロバクテリウムの菌液にシロイヌナズナの花序を浸し、その後結実した種子から形質転換された種子を選抜した。p35S-JAX1 形質転換種子については pEarley ベクター上に搭載されている除草剤バスタに対する耐性遺伝子を利用し、芽生えにバスタ処理することで形質転換種子を選抜した。得られた形質転換植物を *P35S-JAX1* とした。pJAX1-JAX1 形質転換種子については pCAMBIA1301 上に搭載されたハイグロマイシン耐性遺伝子を利用し、種子をハイグロマイシンを添加したムラシゲスクーグ寒天培地上に播種し選抜した。得られた形質転換植物を *PJAX1-JAX1* とした。

3.2.2.5 リアルタイム RT-PCR

ウイルス蓄積量を定量するためのリアルタイム RT-PCR 解析には SYBR Green によるインターカレーター法と Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa) を用いた。上述の通りに抽出した全 RNA に対し DNase I (TaKaRa) を用いて DNA を完全に除去し、cDNA を合成した。cDNA 合成は High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) を用いた。DNase 処理した RNA 1 µg に対し、10 × RT buffer 1 µl、25 × dNTP 0.4 µl、10 × random primer 1 µl、RTase 0.5 µl を加え、DW で最終容量 10 µl とした。逆転写反応は 25°C 10 分、37°C 120 分を行った。得られた cDNA を 100 倍希釈し、これを鋳型として SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa) を用いてリアルタイム PCR 反応を行った。cDNA 2.5 µl に対し、2 × SYBR Premix Ex Taq II 10 µl、各プライマー 0.3 µM を加え、DW で最終容量 20 µl とした。用いたプライマーは表 3.1 に示した。リアルタイム PCR 反応の増幅産物相対定量解析には Thermal Cycler Dice Real Time System Single Software version 1.00 を用い、second derivative maximum 法によって各遺伝子の相対値を算出した。

3.2.3 JAX1 の発現解析

3.2.3.1 発現解析に用いたコンストラクトおよび形質転換植物

Bay-0 より抽出した DNA に対し、JAX1UP-F および JAX1UP-R プライマー (表 3.1) を用い

て約 2 kb の推定 *JAX1* プロモーター領域を増幅した。増幅産物を pCAMBIA1301 上の 35S プロモーター領域と入れ替える形で組換え、pJAX1-GUS を作出した。このベクターを上述の floral dip 法により Col-0 に形質転換し、*PJAX1-GUS* を作出した。コントロールの *P35S-GUS* は pCAMBIA1301 を Col-0 に形質転換することで作出した。

3.2.3.2 β -glucuronidase (GUS) 染色

PJAX1-GUS の植物体を GUS 染色液 (1 mM 5-ブロモ 4-クロロ 3-インドリルグルクロニド (X-gluc)、10 μ g/ml シクロヘキシミド、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、5%メタノール、1 mM DTT) に浸し、30 ~ 40 分間脱気した後 37°C で 3 時間静置した。その後、70%エタノールで脱色し観察した。

3.2.4 *Nicotiana benthamiana* への *JAX1* 形質転換

3.2.4.1 p35S-FLAG-JAX1

3.3.2 と同様の方法で pENTR-JAX1 と Gateway technology を用いて *JAX1* 遺伝子をバイナリーベクター-pEarleyGate 202 にクローニングした。pEarley202 には 35S プロモーターが搭載されており、また目的タンパク質の N 末端に FLAG エピトープタグを付加するような配列を有している。得られたコンストラクトを p35S-FLAG-JAX1 とした。

3.2.4.2 *N. benthamiana* への形質転換

p35S-FLAG-JAX1 の *N. benthamiana* への形質転換は、leaf disk 法により行った。まず、p35S-FLAG-JAX1 をアグロバクテリウムに形質転換した。これを LB/Kan 液体培地で 28°C で一晩振盪培養して菌液を得た。*N. benthamiana* の展開葉を切り取り中性洗剤で洗った後、クリーンベンチ内で 2%次亜塩素酸ナトリウム溶液に 10 ~ 20 分間浸し殺菌した。滅菌水でこれをすすぎ、滅菌濾紙上で 1 cm 四方の切片を作成した。この切片をアグロバクテリウムの菌液に 60 秒浸し、余分な水分を除いて茎葉分化培地 (ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類 1 袋/l、3% ショ糖、0.8% 寒天、1 μ g/ml ベンジルアデニン、0.1 μ g/ml ナフタレン酢酸) に置床した。遮光下 28°C で 2 日間静置した後、アグロバクテリウムを殺菌するためにクラフォランを含んだ (500 μ g/ml) 茎葉分化培地に切片を移し、明所 26°C で 2 日静置した。形質転換された細胞を選抜するためにバスタを含んだ (1 ml/l) 茎葉分化培地に移し、明所 26°C で静置し、2 週間毎に同組成の新しい培地に移した。シュートが分化した後、これを切り取り、クラフォランとバスタを含んだ根分化培地 (ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類 1 袋/l、3% ショ糖、0.8% 寒天) に移した。発根した植物をプラントボックスに作成した根分化培地上に移植し育てた。馴化処理をした後、鉢に移植し栽培した。JAX1-F および JAX1-R プライマーを用いた PCR と FLAG 抗体も用いたウェスタンブロット解析により形質転換の確認を行った。得られた形質転換植物を

P35S-FLAG-JAX1 とした。

3.2.4.3 ウェスタンブロット解析

P35S-FLAG-JAX1 形質転換 *N. benthamiana* より PBS (137mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na₂HPO₄、1.8 mM KH₂PO₄、pH 7.4) を用いて全タンパク質を抽出した。抽出したタンパク質を 12% SDS-PAGE ゲルでサイズ分離し、セミドライ式のブロッキング装置 TRANSBLOT SD (BIO-RAD) を用いて、ゲルから PVDF メンブレン Immobilon-P (Millipore) にタンパク質を転写した。転写後、メンブレンをウェスタンブロット解析した。ウェスタンブロットは ECL Western Blotting Detection System (GE Healthcare) を用いた。転写後のメンブレンを Blocking Buffer (5% スキムミルクを含む PBS) に浸し室温で 2 時間振盪しブロッキングした。ブロッキング後のメンブレンを 1 次抗体として 1,000 倍希釈した monoclonal anti-FLAG M2 from mouse (SIGMA Aldrich)、2 次抗体として 5,000 倍希釈した Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep (GE Healthcare) を用いて抗原抗体反応を行った。メンブレンに ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) を処理し、LAS-4000 mini を用いてシグナルを検出した。

3.2.5 接種葉レベルおよび細胞レベルの JAX1 抵抗性評価

3.2.5.1 アグロインフィルトレーション法によるタンパク質の一過的発現

pPIAMV-GFP、p35S-FLAG-JAX1、pJAX1-JAX1 および vector control として pCAMBIA1301 を保持するアグロバクテリウムを用意した。それぞれの菌をインフィルトレーションバッファーに懸濁し OD 1.0 とした。共発現させたいタンパク質のそれぞれを発現するプラスミドを保持するアグロバクテリウムの懸濁液を 1:1 で混ぜ、*N. benthamiana* の葉にアグロインフィルトレーションした。アグロインフィルトレーションの方法は 3.2.1.3 に記した。JAX1 タンパク質の発現はウェスタンブロット解析により確認した。

3.2.5.2 プロトプラストを用いた解析

・プロトプラストの調整

20 ml のシロイヌナズナ懸濁培養細胞液を遠心して細胞を集め、0.4M マンニトール液で洗浄した。遠心後マンニトール液を除き、10 ml の酵素液 (1% cellulose Onozuka R-10 [Yakult]、0.2% macerozyme R-10 [Yakult]、0.4 M マンニトール、10 mM CaCl₂、20 mM MES-KOH、pH 5.7) を加え 25°C で 90 分間緩やかに振盪した。酵素処理後、細胞を W5 バッファー (154 mM NaCl、125 mM CaCl₂、5 mM KCl、5 mM グルコース、1.5 mM MES-KOH、pH 5.6) で 2 回洗浄し、径 100 μm のナイロンメッシュで濾過しプロトプラストを分離した。

・PEG 法による遺伝子導入

調整したプロトプラストを氷上で 30 分間静置した。血球計算盤を用いてプロトプラストの数を計測し、1 ml 当たり 5×10^6 の密度に W5 バッファーで調整した。プロトプラスト液を遠心し、W5 バッファーを取り除き、取り除いた量と同じ量の MaMg 溶液 (0.4M マンニトール、15 mM MgCl₂、5 mM MES-KOH、pH 5.6) を加え再懸濁した。300 μ l のプロトプラスト液に 100 μ g のサケ精子キャリア DNA を加え、10 μ g の pPLAMV-GFP と共発現したいタンパク質のバイナリーベクタープラスミド DNA を 10 μ g 加えた。vector control として pEarleyGate100 を用いた。次に 300 ml の PEG-CHS 溶液 [0.4 M マンニトール、0.1 M Ca(NO₃)₂、40% polyethylene glycol 4000] をプロトプラストとプラスミドの混合液に加えた。室温で 30 分間静置後、10 ml の W5 バッファーで 2 回洗浄した。遺伝子導入したプロトプラストは 2 ml の W5 バッファーに再懸濁し、遮光下 23°C で静置したのち観察した。

3.2.6 HR 細胞死の検出

3.2.6.1 トリパンブルー染色

トリパンブルーは死細胞を青く染色する試薬である。これを用いてウイルス接種葉の死細胞を観察した。トリパンブルーを含むラクトフェノール溶液 (10 g フェノール、10ml グリセロール、10 ml 乳酸、10 ml DW、10 mg トリパンブルー) を 99%エタノールで 2 倍希釈した溶液に接種 4 日後の接種葉を浸し、3 分間煮沸し室温で一晩静置した。染色した葉を抱水クロラール溶液 (抱水クロラール 1 kg を DW400 ml に溶解したもの) で脱色した。

3.2.6.2 3,39-diaminobenzidine (DAB) 染色

DAB はペルオキシダーゼの発色基質であり、ペルオキシダーゼと活性酸素の存在下で褐色に発色し、沈着する。これを用いてウイルス接種葉の H₂O₂ の蓄積を検出した。1 mg/ml の DAB 溶液に接種 4 日後の接種葉を浸し、30 ~ 40 分脱気した後遮光下室温で 2 時間静置した。99%エタノール中で脱色し、脱色後エタノールを水に置換した。

3.2.7 植物ホルモン経路の変異体

植物ホルモン経路の変異体 *eds5-1* (Glazebrook et al., 1996)、*ein2-1* (Alonso et al., 1999)、*jar1-1* (Staswick et al., 1992) を ABRC より入手した。それぞれバックグラウンドは Col-0 で、*eds5-1* はサリチル酸合成経路の変異体、*ein2-1* はエチレンシグナル伝達経路の変異体、*jar1-1* はジャスモン酸シグナル伝達経路の変異体である。

3.2.8 RNAサイレンシングとJAX1抵抗性の比較で用いたコンストラクト

pIR-GFPは千秋らの作成した35Sプロモーター下にGFPの逆方向反復配列を持つベクターで、GFPの二本鎖RNA配列を発現し、GFP RNA配列に対するRNAサイレンシングを誘導するベクターである(Senshu et al., 2009)。

p19は*Tomato bushy stant virus* (TBSV)が有するRNAサイレンシングサプレッサーである。p19はRNAサイレンシング経路で産出されるsiRNAと結合することで、ウイルスRNAの切断を妨げる。ここでは、D. C. Baulcombe博士より分譲いただいたp19を発現するバイナリベクターpBin-P19を用いて実験を行った。

3.2.9 JAX1抵抗性の範囲

3.2.9.1 P35S-FLAG-JAX1形質転換*N. benthamiana*への様々なウイルスの接種

*N. benthamiana*を宿主とし明瞭な病徴を引き起こす下記のウイルスを選び、機械的に接種した。それぞれのウイルスを検出するプライマーは表3.1に記した。

potato virus X (PVX, Genus *Potexvirus*), white clover mosaic virus (WCIMV, Genus *Potexvirus*), asparagus virus 3 (AV3, Genus *Potexvirus*), tobacco mosaic virus (TMV, Genus *Tobamovirus*), cucumber mosaic virus (CMV, Genus *Cucumovirus*), tobacco rattle virus (TRV, Genus *Tobravirus*), turnip mosaic virus (TuMV, Genus *Potyvirus*), tobacco etch virus (TEV, Genus *Potyvirus*), potato virus Y (PVY, Genus *Potyvirus*), radish mosaic virus (RaMV, Genus *Comovirus*)

3.2.9.2 RTM1抵抗性とJAX1抵抗性との比較で用いたコンストラクト

・pTEV-GFP

TEV-GFPの感染性バイナリクローンを作成するために、TEVのHATシステムをAmerican Type Culture Collection (ATCC)より取り寄せ、pCAMBIA1301に*GUS*遺伝子と入れ替える形でクローニングし、pCAMBIA-TEVを作成した。このTEV配列中のP1とHC-Proの切断サイトに12塩基(5'-CCCGGGAGATCT-3')のマルチクローニングサイトを挿入した。ここにGFP遺伝子のcDNA配列を挿入し、pTEV-GFPを作成した。

・p35S-RTM1

Col-0より抽出したRNAに対し、RTM1-FとRTM1-Rプライマーを用いたRT-PCRによりRTM1のcDNA断片を得た。これを3.2.2に記した方法によりpEarleyGate100にクローニングした。これをp35S-RTM1とした。

3.3 結果

3.3.1 抵抗性エコタイプのスクリーニング

植物ウイルスへの抵抗性遺伝子を同定するために、PIAMV に対して抵抗性を示すシロイヌナズナエコタイプのスクリーニングを行った。感受性エコタイプと抵抗性エコタイプを簡便に識別するために、PIAMV-GFP をアグロインフィルトレーションにより接種し、接種 20 日後にウイルス感染の有無を UV 照射下での GFP 蛍光を目視により判定した (図 3.2)。1 次スクリーニングには 45 のエコタイプを供試し、抵抗性エコタイプの候補を 2 次スクリーニングに供試した。その結果、Bayreuth-0 (Bay-0)、Drahonin-2 (Dra-2)、Eilenburg-0 (Eil-0)、Gabelstein-0 (Ga-0)、Isenburg-1 (Is-1) の 5 つのエコタイプで GFP 蛍光が上位葉で観察されなかった (図 3.3A)。一方で、Columbia-0 (Col-0) や *Landsberg erecta* (Ler) を含むその他のエコタイプでは植物体全身で GFP 蛍光が観察されたため、感受性エコタイプと判断した。GFP 蛍光での判別結果を検証するために、ウイルス特異的プライマーを用いた RT-PCR を行った。PIAMV-GFP を接種した上記 5 つのエコタイプおよび Col-0 の接種葉または上位葉より RNA を抽出し、RT-PCR により PIAMV を検出した。その結果、全てのエコタイプで接種葉では PIAMV が検出されたが、Col-0 以外の 5 つのエコタイプでは上位葉からは PIAMV は検出されなかった (図 3.3B)。以上より、Bay-0、Dra-2、Eil-0、Ga-0、Is-1 を PIAMV に対する抵抗性エコタイプとして選抜した。

次に、これらのエコタイプが示す抵抗性の特徴を解析した。抵抗性を詳細に解析するために PIAMV-GFP をアグロインフィルトレーション法ではなく機械的に接種した。上記で観察された 5 つの抵抗性エコタイプの抵抗性の表現型は似ていたもので、ここでは Bay-0 の表現型を詳細に解析することにした。まず、接種葉または上位葉でのウイルス蓄積量を Col-0 と Bay-0 とで比較するために、PIAMV 特異的なプローブを用いてノーザンブロット解析を行った。上位葉では Col-0 でのみ PIAMV の蓄積が検出され Bay-0 では検出されなかった (図 3.4A)。これは 1 次スクリーニングの結果と一致していた (図 3.3)。接種葉での PIAMV 蓄積量は Col-0 と比べて Bay-0 で著しく低下していた (図 3.4A)。UV 照射下による GFP 蛍光を観察した結果においても接種葉における GFP 蛍光斑は Col-0 と比べ Bay-0 で小さくなり、数も少なかった (図 3.4BC)。接種葉における PIAMV-GFP の広がりも Col-0 に比べて Bay-0 で遅かった。Bay-0 の接種葉における 1 つの蛍光斑に含まれる細胞数は、接種 2 日後および 3 日後で Col-0 より少なかった (表 3.2)。接種 3 日後から 5 日後において同じ蛍光斑を観察したところ、蛍光の広がりも Col-0 に比べ Bay-0 で遅かった (図 3.5)。以上の結果より抵抗性エコタイプ Bay-0 においては、接種葉における PIAMV の蓄積が抑制されていることが示された。

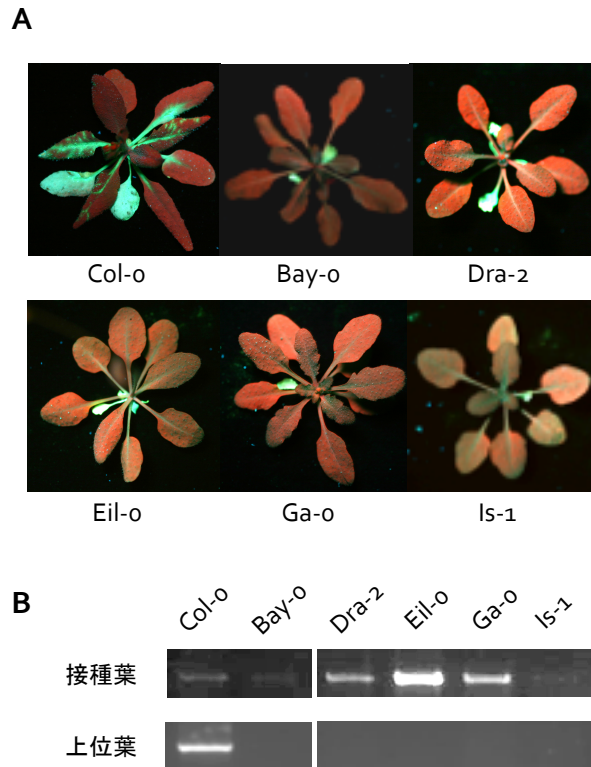


図 3.3 抵抗性シロイヌナズナエコタイプのスクリーニング結果

(A) PIAMV-GFP が全身感染できない抵抗性エコタイプ。エコタイプ Col-0、Bay-0、Dra-2、Eil-0、Ga-0、Is-1 に PIAMV-GFP をアグロインフィルトレーション法により接種し、GFP 蛍光を接種 20 日後に UV 照射下で観察した。Col-0 では PIAMV-GFP の蛍光が全身で観察された一方で、Bay-0、Dra-2、Eil-0、Ga-0、Is-1 では接種葉でのみ蛍光が観察された。

(B) (A) の 5 つのエコタイプの接種葉および上位葉からの PIAMV-GFP RNA の検出。PIAMV-GFP の RNA を CP 特異的プライマーにより増幅した。

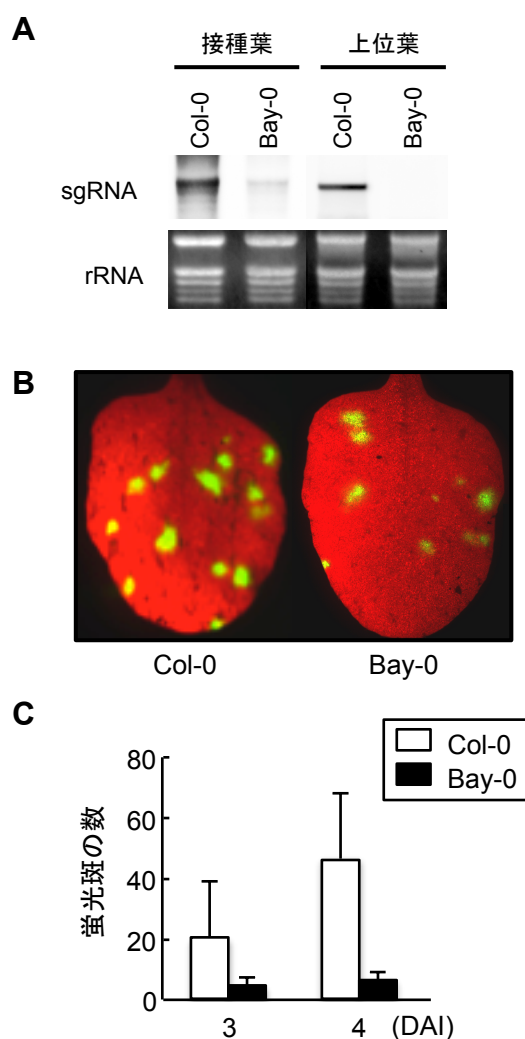


図 3.4 Bay-0 のウイルス抵抗性

(A) Col-0 および Bay-0 における接種葉および上位葉でのウイルス蓄積。ウイルス抵抗性を評価するため、PIAMV-GFP 感染植物の粗汁液を Col-0 および Bay-0 に機械的に接種した。接種 4 日後接種葉および接種 20 日後の上位葉より抽出した全 RNA に対し CP 特異的プローブを用いたノーザンブロット解析により PIAMV-GFP のプラス鎖を検出した。rRNA をエチジウムブロマイド染色し、ローディングコントロールとした。

(B) Col-0 および Bay-0 の接種葉における PIAMV-GFP による蛍光斑。(A)で PIAMV-GFP を接種した Col-0 および Bay-0 の接種葉を接種 3 日後に UV 照射下で観察した。

(C) 両エコタイプの PIAMV 接種葉における蛍光斑の数。(B)における蛍光斑の数を両エコタイプともそれぞれ 4 枚の接種葉について接種 3 日後、4 日後に計測した。グラフは 4 枚の蛍光斑数の平均値を示した。エラーバーは標準偏差を示す。

表 3.2 Col-0 と Bay-0 の接種葉における PLAMV-GFP 蛍光斑のサイズ比較

接種後 日数 (DAI)	エコタイプ	合計 ^a (n)	1細胞 ^b (n [%])	2細胞 (n [%])	3細胞 (n [%])	≥4細胞 (n [%])
2	Col-0	55	12 (22)	5 (9)	6 (11)	32 (58)
	Bay-0	6	2 (33)	1 (17)	1 (17)	2 (33)
3	Col-0	33	3 (9)	1 (3)	0 (0)	29 (88)
	Bay-0	11	4 (36)	1 (9)	0 (0)	6 (55)

PLAMV-GFP 感染植物の粗汁液を Col-0 および Bay-0 に機械的に接種し、接種葉におけるウイルス蛍光斑を蛍光実体顕微鏡下で観察した。

^a 蛍光斑の数の合計

^b 蛍光斑の数とそれぞれの割合

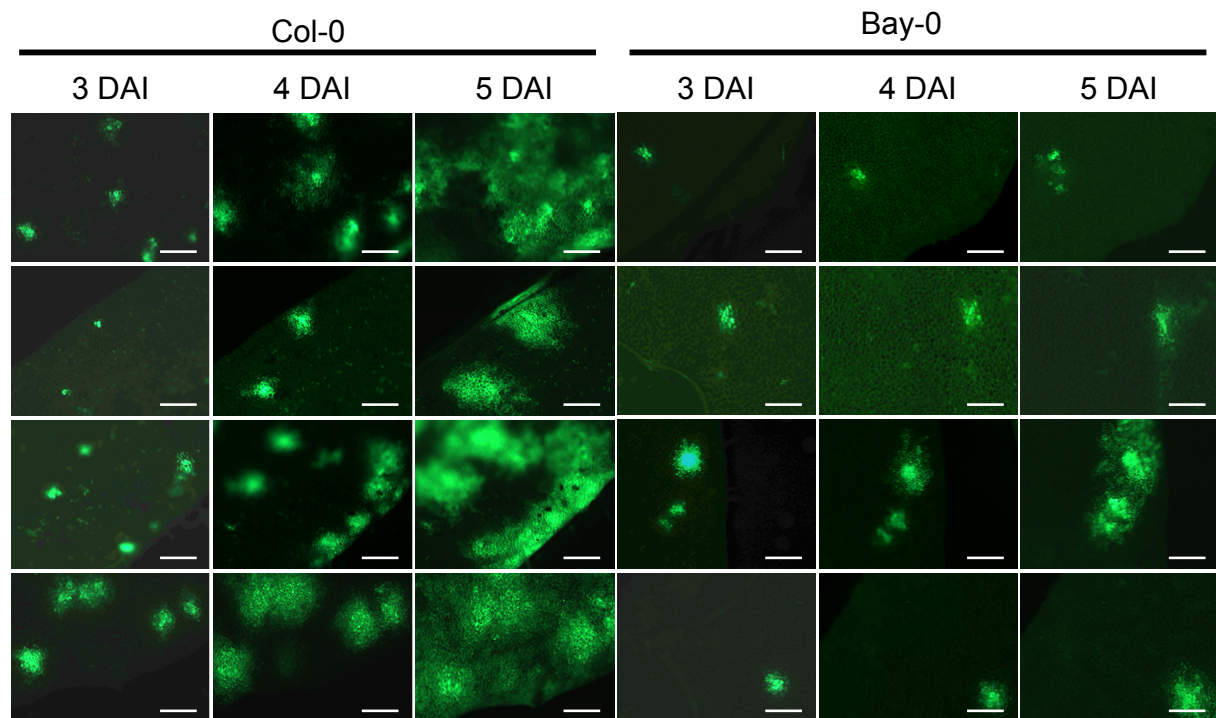


図 3.5 Col-0 および Bay-0 の接種葉での PLAMV-GFP 感染広がり比較

PLAMV-GFP 感染植物の粗汁液を Col-0 および Bay-0 に接種した。接種葉を切り取り密閉した湿室に静置した。3、4、5 日後に蛍光実体顕微鏡で接種葉の同じ組織を観察した。4 回の反復を行った。スケールバーは 0.5 mm。

3.3.2 抵抗性遺伝子のマップベースクローニング

ウイルス抵抗性の遺伝学的基盤を明らかにするために、Col-0 と Bay-0 を交配しその子孫世代を用いて表現型の分離比分析を行った。F1 世代に PIAMV-GFP を接種し UV 照射下で観察したところ、PIAMV-GFP が全身感染する個体は無く、F1 世代の個体全てが PIAMV 抵抗性であった (表 3.3)。このことは Bay-0 の PIAMV 抵抗性という表現型が優性であることを示していた。F1 世代を自殖させた F2 世代 100 個体に PIAMV-GFP を接種したところ、29 個体で PIAMV-GFP が全身感染し、71 個体で全身感染しなかった (表 3.3)。この抵抗性個体と感受性個体の個体数の比 71:29 は χ^2 検定により 3:1 に分離していることが確かめられた ($\chi^2 = 0.85$; $p > 0.2$)。よって Bay-0 の PIAMV 抵抗性は単一優性遺伝子座によるものであることが示された。Dra-2、Eil-0、Ga-0、Is-1 それぞれと Col-0 の交配による分離比分析も同様の結果が得られた (表 3.4)。

染色体上の抵抗性遺伝子領域を絞り込むためにマップベースクローニングを行った。PIAMV 抵抗性は優性抵抗性であるため、Col-0 と Bay-0 の交配による F2 世代を用いた。まず 23 の SSLP マーカーを用いて連鎖解析を行い、抵抗性遺伝子座が 1 番染色体上の SSLP マーカー nga280 と最も強く連鎖し、抵抗性遺伝子座のセントロメア側の SSLP マーカー ciw1 とテロメア側の SSLP マーカー nF5I14 と同時連鎖することが明らかとなった (図 3.6A)。Dra-2、Eil-0、Ga-0、Is-1 それぞれと Col-0 の交配による F2 を用いた連鎖解析でもそれぞれのエコタイプの抵抗性遺伝子座は同様に SSLP マーカー nga280 と最も強く連鎖した (表 3.5)。Bay-0 の抵抗性遺伝子座を同定するために、さらに SNP マーカーを用いた連鎖解析を行った。SSLP マーカー ciw1 と nF5I14 の間に設計した 6 つの SNP マーカー (表 3.1) を用いて F2 世代のゲノムの当該領域を増幅し、配列を Col-0 型か Bay-0 型か調べた。その結果、SNP マーカー SNP21.4 と SNP21.6 の間の 130 kb に抵抗性遺伝子座を絞り込んだ (図 3.6A)。

抵抗性遺伝子を同定するために TAIR のデータベースを参照し、この 130 kb 内にある遺伝子のアノテーションを調べた。NLR 型の遺伝子はこの領域には存在しなかったが、ジャカリンレクチンをコードする遺伝子座 *At1g58160* を見出した。この遺伝子はポティウイルスに対する抵抗性遺伝子 *RTM1* と類似していた (Chisholm et al., 2000)。Bay-0 および Col-0 の本遺伝子座のゲノム DNA および cDNA の配列を解析したところ塩基の多型が存在した。Bay-0 の cDNA 配列においては *At1g58160* タンパク質 157 aa の完全な ORF がコードされていた。一方、Col-0 の配列においては TAIR のデータベース上の情報と異なり、第 1 エキソンに終止コドンが存在し、*At1g58160* タンパク質の N 末端 36 aa のみ翻訳されるような配列であった (図 3.6B、3.7AB)。Bay-0 以外の抵抗性エコタイプ (Dra-2, Eil-0, Ga-0, and Is-1) の *At1g58160* の配列にも完全長のタンパク質がコードされており、一方で感受性エコタイプ *Ler* では Col-0 と同様に N 末端の 36 aa の断片が翻訳されるような配列となっていた (図 3.7B)。*At1g58160* はジャカリンレクチンをコードしていたことと、以下に記述する抵抗性の相補試験の結果から本遺伝子を *JAX1*

(*JACALIN-TYPE LECTIN REQUIRED FOR POTEXVIRUS RESISTANCE 1*)と名付けた。

JAX1 は、RTM1 や jacalin と類似した単一のジャカリンレクチンドメインを有している。ジャカリン様タンパク質は 7 つの植物レクチンファミリーの 1 つである (Van Damme et al., 1998)。jacalin のインタクトな ORF は 217 aa のポリペプチドをコードしているが、成熟型の jacalin は 4 つのサブユニットから構成され、各サブユニットは翻訳後プロセッシングにより生じた 133 aa の α 鎖と 20 aa の β 鎖からなる。JAX1、RTM1 および jacalin のアミノ酸配列を比較したところ α 鎖は JAX1 と RTM1 で保存されている一方で、 β 鎖は欠いていた (図 3.6C)。シロイヌナズナのゲノム上には 48 のジャカリンレクチン遺伝子が存在し、これらはそれぞれ 1 つから 6 つの jacalin α 鎖を有している (Nagano et al., 2008)。これらの中で単一の jacalin α 鎖のみを有しているのは JAX1 と RTM1 を含めて 9 つのみである。JAX1 のアミノ酸配列は RTM1 と 37%、jacalin と 29%の配列類似度を示した。

Bay-0 の PIAMV 抵抗性が *JAX1* によって与えられるものであるかを調べるために、Bay-0 のゲノム DNA 断片を Col-0 に形質転換することで相補試験を行った。*JAX1* の ORF と推定プロモーター領域を含む約 3.5 kb の DNA 断片を Bay-0 よりクローニングしたコンストラクト pJAX1-JAX1 を作出した。この pJAX1-JAX1 を *Agrobacterium* により Col-0 に形質転換した。得られた形質転換体 (*PJAX1-JAX1*) にアグロインフィルトレーション法によって PIAMV-GFP を接種したところ、ほとんどの形質転換体で全身感染しなかった (73 個体中 61 個体) (図 3.8A)。PIAMV 特異的プライマーを用いたリアルタイム RT-PCR 解析により接種葉および上位葉での PIAMV-GFP の蓄積量を形質転換体と非形質転換体とで比較した。その結果、接種葉での蓄積量は *PJAX1-JAX1* と非形質転換体とで差は無かったが、上位葉においては *PJAX1-JAX1* で顕著に蓄積量が抑えられていた (図 3.8B)。この抵抗性の表現型は Bay-0 のものに似ていた (図 3.3)。さらに、*JAX1* 遺伝子産物を過剰発現させるため、*JAX1* の cDNA 断片を CaMV の 35S プロモーターと融合させたコンストラクト p35S-JAX1 を作出し、Col-0 に形質転換した。得られた形質転換体 (*P35S-JAX1*) に PIAMV-GFP を接種したところ、全ての形質転換体で全身感染しなかった (10 個体中 10 個体) (図 3.8A)。リアルタイム RT-PCR の結果、*P35S-JAX1* では上位葉のみならず、接種葉においても PIAMV の RNA は検出されなかった (図 3.8B)。以上の結果より、*JAX1* は Bay-0 における PIAMV 抵抗性を司る遺伝子であることが示された。

表 3.3 Bay-0 の抵抗性表現型の遺伝解析およびシグナル経路変異体の PIAMV に対する反応

植物	抵抗性	感受性
Col-0	0	21
Bay-0	21	0
F1 (Col-0 X Bay-0)	10	0
F2	71 ^a	29 ^a
eds5-1 / JAX1 ^b	10	0
jar1-1 / JAX1 ^b	10	0
ein2-1 / JAX1 ^b	10	0

表に示した植物に PIAMV-GFP を接種した。ウイルス感染に対する反応を接種 20 日後に GFP 蛍光が全身に広がったか (感受性)、全身に広がらなかったか (抵抗性) で評価した。

^a χ^2 (3:1) = 0.85; $P > 0.2$

^b eds5-1、jar1-1 および ein2-1 の遺伝的バックグラウンドは Col-0。

表 3.4 Dra-2、Eil-0、Ga-0 および Is-1 における抵抗性の遺伝的解析

植物	抵抗性	感受性
Dra-2	7	0
Eil-0	7	0
Ga-0	7	0
Is-1	7	0
F1 (Col-0 X Dra-2)	4	0
F2 (Col-0 X Dra-2)	87 ^a	28 ^a
F1 (Col-0 X Eil-0)	NT ^b	NT
F2 (Col-0 X Eil-0)	90 ^c	19 ^c
F1 (Col-0 X Ga-0)	5	0
F2 (Col-0 X Ga-0)	89 ^d	22 ^d
F1 (Col-0 X Is-1)	5	0
F2 (Col-0 X Is-1)	103 ^e	21 ^e

上記の植物に PIAMV-GFP を接種した。接種 20 日後に PIAMV-GFP の GFP 蛍光の広がりを観察し、全身に広がっているものを感受性、全身に広がらなかったものを抵抗性とした。

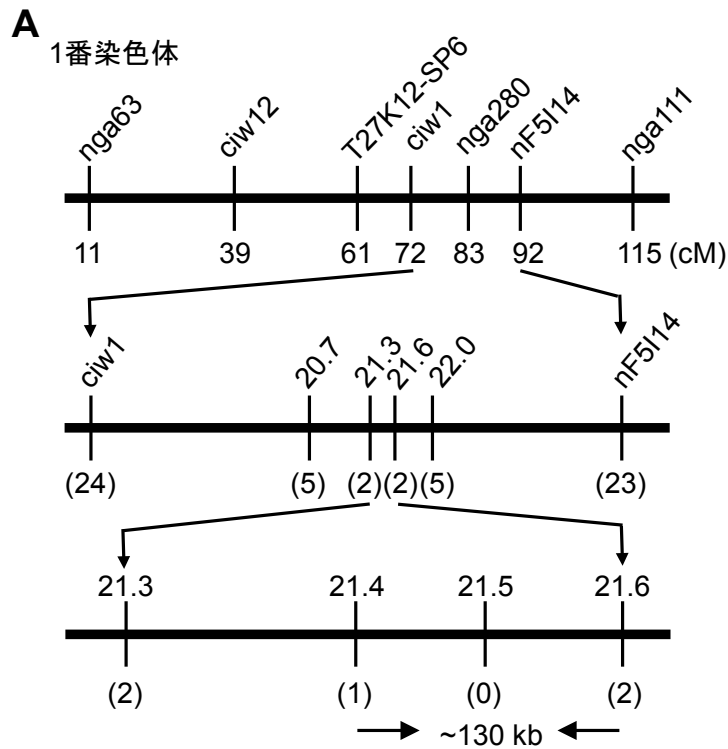
^a χ^2 (3:1) = 0.026; $P > 3$

^b NT ; not tested

^c χ^2 (3:1) = 3.33; $0.02 > P > 0.01$

^d χ^2 (3:1) = 1.59; $P > 0.05$

^e χ^2 (3:1) = 4.30; $0.01 > P > 0.005$



C

```

JAX1 : -----MTPSGNPT : 10
RTM1 : -----MKI : 3
jacalin : MAYSSLLSLSVLALLFSISSADTRKWFLANGINQNPIGIIEAVGVEDL : 50

JAX1 : PMADKLEAKG-----GNGEKIWDIGVPEGVSOIY : 39
RTM1 : GPFGKHDARS-----ITIVNDEGSDFCFISQI : 31
jacalin : LNLNGMEAKNDEQSGISQTVIVGPGWAKVSTSENGRAFDDGAFTRREIN : 100
          <-----β-chain----->

JAX1 : IQEGSTGCTASIKEDYKNGQEKACSTHGCSYHNEEWFDLNHTCDHII : 89
RTM1 : FLSHGVAGITMSIQCFVMDCKLVIIDSRHEPESGNMFDVIELNYPHEYITG : 81
jacalin : ISYNKETAAGDFVVDINGSEYVQNHKSEITGEPYKISLDFPSEYIV : 150
          <-----α-chain----->

JAX1 : SKRCYDDEGE---IQGLVIKTNIRRSAYMGYNIGTITTEVVRGKR--- : 132
RTM1 : ISGEYKYEANNPHMRSLKENTNTSEYCPPEGTSGSSNDKFAFKLCKSPQF : 131
jacalin : EYSGYTGNVSGYVVVRSITTEKTNKKTYPYGVVSCITPENIPEENGL--- : 197

JAX1 : VGFHGSFDKNITSLGAYFAPLPAK----- : 157
RTM1 : GGFHGTVDASGLQVIGVYRERKIVLPKIDTGNAAEETESKIVLG : 174
jacalin : VGFKGSIGYWLDYFSMYISL----- : 217
  
```

図 3.6 *JAX1* 遺伝子のクローニング

(A) 連鎖解析による抵抗性遺伝子座の同定。上段の図で1番染色体上の SSLP マーカーの位置と遺伝的距離を cM で示した。下段には抵抗性遺伝子座の候補領域を絞り込むために設計した SNP マーカーを示した。括弧内には 1500 の F2 個体のうちマーカーの位置で組換えが起きた個体数を示した。抵抗性遺伝子座は SNP21.4 と SNP21.6 の間の約 130 kb の領域にマッピングされた。

(B) *JAX1* の cDNA 遺伝子構造の模式図。開始コドン (83 塩基)、5'-イントロンスプライシングサイト (313 nt)、終止コドン (873 nt)、3'末端 (959 nt) の位置を示した。模式図の下に配列解析で見出された Col-0 と Bay-0 の塩基多型を示した。

(C) Bay-0 *JAX1* の推定アミノ酸配列、jacalin、RTM1 アミノ酸配列のアライメント。灰色および黒でそれぞれ保存された残基および同一の残基を示した。両矢印で jacalin の α 鎖と β 鎖の位置を示した。

表 3.5 1 番染色体上の SSLP マーカーを用いた Dra-2、Eil-0、Ga-0 および Is-1 の連鎖解析

抵抗性エコタイプ	nga63	ciw1	nga280	nga111
Dra-2	17/40	4/40	0/42	NT ^a
Eil-0	15/38	NT	0/36	8/36
Ga-0	NT	NT	0/38	NT
Is-1	NT	2/28	0/36	NT

抵抗性エコタイプを Col-0 と交配した F1 植物を自家交配して F2 個体を得た。

PIAMV-GFP 感受性 F2 個体を 1 番染色体上の SSLP マーカーを用いて解析した。各マーカーでの組換え個体の数を示した。

^a NT ; not tested

A

```

Bay-0 : ATGCTACACCATCAGGTTCAAATCCGTTACCAATGCCGACAAAGTTAGAAGCAAAAGGT : 60
Col-0 : ATGCTACACCATCAGGTTCAAATCCGTTACCAATGCCGACAAAGTTAGAAGCAAAAGGT : 60

Bay-0 : GGAATGGAGGGAAGATATGGGATGATGGAGTCCATGAAGGAGTGTCTCAAATCTATATA : 120
Col-0 : GGAATGGAGGGAAGATATGGGATGATGGAGTCCATGAAGGAGTGTCTCAAATCTATATA : 120

Bay-0 : CAAGAGGGTTCTACAGGTCGTATAGCATCCATCAAGTTCGACTATGTCAAGAATGGTCAA : 180
Col-0 : CAAGAGGGTTCTACAGGTCGTATAGCATCCATCAAGTTCGACTATGTCAAGAATGGTCAA : 180

Bay-0 : CCTAAAGCTGGATCAACCCATGGTACCTGCTATCACAATTTCAACGAGTGGTTTGTATCTT : 240
Col-0 : CCTAAAGCTGGATCAACCCATGGTACCTGCTATCACAATTTCAACGAGTGGTTTGTATCTT : 240

Bay-0 : AACCATACATGCCATGAGCATACTTATCTGTGAAGTGTACTACGATGAGGGTGAGATA : 300
Col-0 : AACCATACATGCCATGAGCATACTTATCTGTGAAGTGTACTACGATGAGGGTGAGATA : 300

Bay-0 : CAAGGACTTGTGATCAAAACCAATATCAGGACTCTGTCATATATGGGATATAACATTGGT : 360
Col-0 : CAAGGACTTGTGATCAAAACCAATATCAGGACTCTGTCATATATGGGATATAACATTGGT : 360

Bay-0 : ACTACGTTTACACTTGAAGTCAAAGGCAAGAAGATCGTTGGGTTTCATGGATCTTTTGAT : 420
Col-0 : ACTACGTTTACACTTGAAGTCAAAGGCAAGAAGATCGTTGGGTTTCATGGATCTTTTGAT : 420

Bay-0 : AAAAACCTTACCTCGCTTGGAGCTTATTTTCGCACCGCTTTCTCCTGCTAAGTAA : 474
Col-0 : AAAAACCTTACCTCGCTTGGAGCTTATTTTCGCACCGCTTTCTCCTGCTAAGTAA : 474

```

B

```

Bay-0 : MSTPSGSNPLPMADKLEAKGGNGGKIWDDGVHEGVSCQIYIQEGSTGGIASIKFDYVKNQC : 60
Ga-0 : MSTPSGSNPLPMADKLEAKGGNGGKIWDDGVHEGVSCQIYIQEGSTGGIASIKFDYVKNQC : 60
Dra-2 : MSTPSGSNPLPMADKLEAKGGNGGKIWDDGVHEGVSCQIYIQEGSTGGIASIKFDYVKNQC : 60
Eil-0 : MSTPSGSNPLPMADKLEAKGGNGGKIWDDGVHEGVSCQIYIQEGSTGGIASIKFDYVKNQC : 60
Is-1 : MSTPSGSNPLPMADKLEAKGGNGGKIWDDGVHEGVSCQIYIQEGSTGGIASIKFDYVKNQC : 60
Col-0 : MSTPSGSNPLPMADKLEAKGGNGGKIWDDGVHEGVSC----- : 36
Ler : MSTPSGSNPLPMADKLEAKGGNGGKIWDDGLHEGVSC----- : 36

Bay-0 : PKAGSTHGTSYHNFTEWFDLNHTCDEHILSVKCYDEGEIQGLVIKTNIRTSAYMGYNIG : 120
Ga-0 : PKAGSTHGTSYHNFTEWFDLNHTCDEHILSVKCYDEGEIQGLVIKTNIRTSAYMGYNIG : 120
Dra-2 : PKAGSTHGTSYHNFTEWFDLNHTCDEHILSVKCYDEGEIQGLVIKTNIRTSAYMGYNIG : 120
Eil-0 : PKAGSTHGTSYHNFTEWFDLNHTCDEHILSVKCYDEGEIQGLVIKTNIRTSAYMGYNIG : 120
Is-1 : PKAGSTHGTSYHNFTEWFDLNHTCDEHILSVKCYDEGEIQGLVIKTNIRTSAYMGYNIG : 120
Col-0 : ----- : -
Ler : ----- : -

Bay-0 : TTFTELVKGGKIVGFHGSFDKNTSLGAYFAPLSPAK : 157
Ga-0 : TTFTELVKGGKIVGFHGSFDKNTSLGAYFAPLSPAK : 157
Dra-2 : TTFTELVKGGKIVGFHGSFDKNTSLGAYFAPLSPAK : 157
Eil-0 : TTFTELVKGGKIVGFHGSFDKNTSLGAYFAPLSPAK : 157
Is-1 : TTFTELVKGGKIVGFHGSFDKNTSLGAYFAPLSPAK : 157
Col-0 : ----- : -
Ler : ----- : -

```

図 3.7 *At1g58160* cDNA 配列の解析

(A) Col-0 および Bay-0 の *At1g58160* 塩基配列のアライメント。*At1g58160* の cDNA を Col-0 および Bay-0 から抽出した全 RNA から増幅した後、配列を決定しアライメントを作成した。赤枠は Col-0 の *At1g58160* cDNA に見出された終止コドンの位置を示す。

(B) *At1g58160* にコードされるタンパク質のアミノ酸配列アライメント。Bay-0、Ga-0、Dra-2、Eil-0、Is-1、Col-0 および *Ler* が有する *At1g58160* cDNA の推定アミノ酸配列のアライメントを作成した。PIAMV 抵抗性エコタイプ (Bay-0、Ga-0、Dra-2、Eil-0、Is-1) は 157 aa のタンパク質をコードしているのに対し、感受性エコタイプ (Col-0、*Ler*) は N 末端の 36 aa 断片をコードしていた。

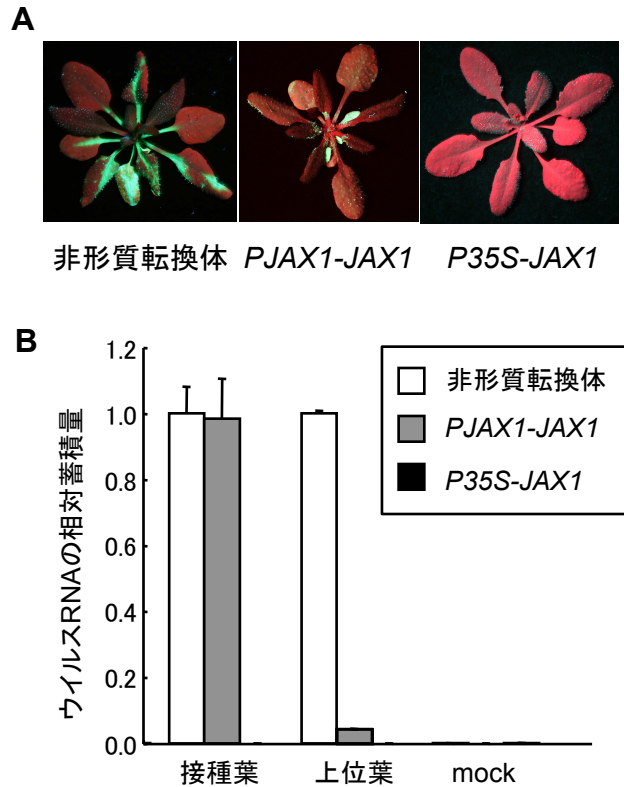


図 3.8 *JAX1* 遺伝子の相補解析

(A) *JAX1* 形質転換 Col-0 における PIAMV-GFP の全身感染阻害。非形質転換 Col-0、*PJAX1-JAX1* および *P35S-JAX1* 形質転換 Col-0 にアグロインフィルトレーション法により PIAMV-GFP を接種した。接種 20 日後に UV 照射下で観察した。GFP 蛍光はウイルス感染を示す。

(B) *JAX1* 形質転換植物における PIAMV-GFP RNA の定量解析。PIAMV-GFP 接種植物 6 個体の接種 5 日後の接種葉、接種 20 日後の上位葉およびコントロールとしてバッファーのみを接種した植物 (mock) 3 個体の接種 20 日後の上位葉から全 RNA を抽出した。非形質転換植物、*PJAX1-JAX1* および *P35S-JAX1* 形質転換植物のそれぞれの抽出 RNA に対し、リアルタイム RT-PCR 解析をした。内在性アクチンの mRNA 蓄積量を内部標準として用いた。非形質転換植物の接種葉における PIAMV-GFP RNA の蓄積量の平均値を基準 (1.0) とした相対蓄積量を示した。エラーバーは標準偏差を示す。

3.3.3 *JAX1* の発現解析

JAX1 が組織特異的な発現パターンを示すかを調べるために、Bay-0 の各組織から抽出した RNA に対し、*JAX1* 特異的プローブを用いてノーザンブロット解析を行った。ロゼット葉と花では同程度の *JAX1* 転写産物が検出された (図 3.9A)。ステムにおいて *JAX1* mRNA レベルが上昇しており、根では検出限界以下であった。次に、組織内での詳細な発現パターンを調べるために、GUS 染色による組織化学解析を行った。*GUS* 遺伝子を *JAX1* プロモーターもしくは 35S プロモーターの制御下に置いたバイナリーベクターを Col-0 に形質転換した。GUS 染色の結果 *P35S-GUS* 発現植物では葉のほとんどの細胞が発色するのに対し、*PJAX1-GUS* 発現植物では主に維管束で発色が検出された (図 3.9B)。さらに、*PJAX1-GUS* では子葉において維管束とその周辺の細胞が、ステムにおいて維管束での発色が検出された。根においては維管束での発色に加え、頂端分裂組織での強い発色が検出された (図 3.10)。

次に *JAX1* の発現がウイルス接種により変動するかを調べた。PIAMV 接種葉を接種時点から経時的に採集し、それらから全 RNA を抽出し *JAX1* 特異的プローブを用いたノーザンブロット解析を行った。その結果、PIAMV 接種葉での *JAX1* mRNA の蓄積量はウイルス非接種葉に比べ、増大することも減少することも無かった (図 3.9C)。これらの結果から *JAX1* の発現は PIAMV の感染に反応しないことが示された。

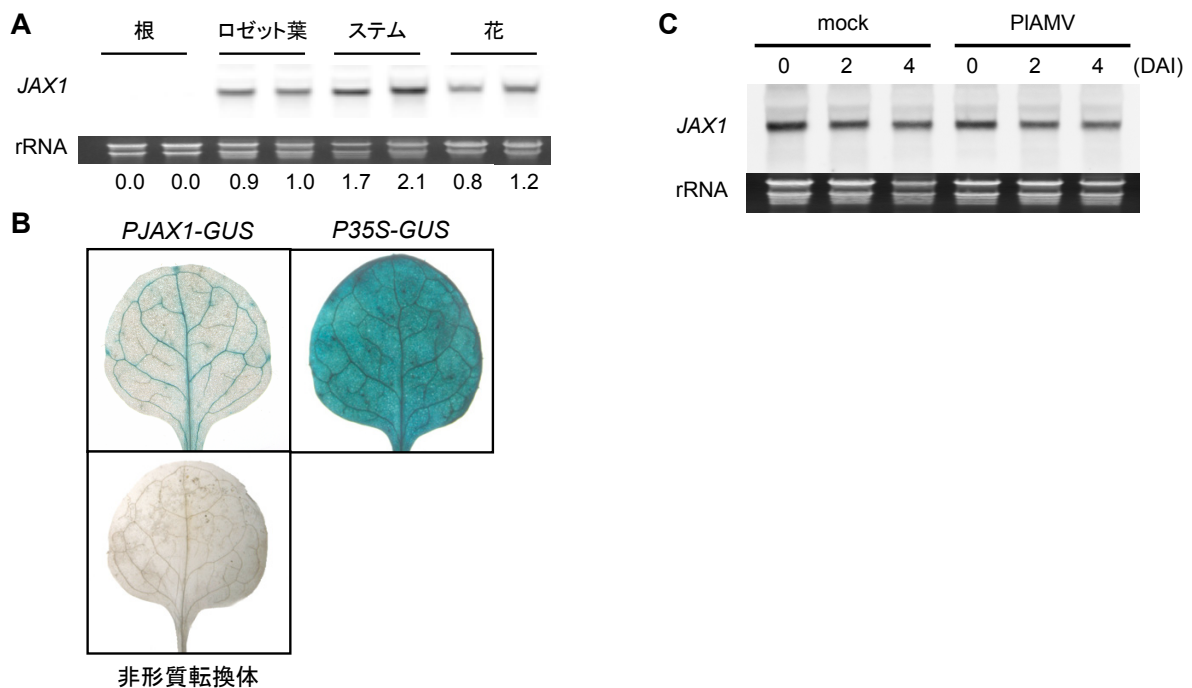


図 3.9 *JAX1* の発現解析

(A) *JAX1* の組織特異的な発現パターン。Bay-0 エコタイプの根、ロゼット葉、ステム、花より全

RNA を抽出し、*JAX1* cDNA をプローブとしてノーザンブロット解析を行い、*JAX1* 転写産物の量を解析した。rRNA をエチジウムブロマイド染色し、ローディングコントロールとした。植物 2 個体を各組織の解析に用いた。下段にロゼット葉における蓄積量の平均値を基準 (1.0) とした *JAX1* mRNA の相対蓄積量を示した。

(B) GUS を用いた *JAX1* 発現パターンの組織化学解析。*JAX1* プロモーターもしくは 35S プロモーター融合 GUS 遺伝子を Col-0 に形質転換した (それぞれ *PJAX1-GUS*、*P35S-GUS*)。形質転換植物に GUS の基質である X-gluc を浸潤し、37°C で 12 時間静置し、GUS 発現パターンを観察した。非形質転換 Col-0 をネガティブコントロールとして用いた。

(C) ウイルス接種葉における *JAX1* 転写量。PIAMV 接種植物およびコントロールとしてバッファのみを接種した植物 (mock) の接種 0 日、2 日、4 日後の接種葉から抽出した全 RNA に対し *JAX1* cDNA をプローブとしてノーザンブロット解析を行った。rRNA をエチジウムブロマイド染色し、ローディングコントロールとした。

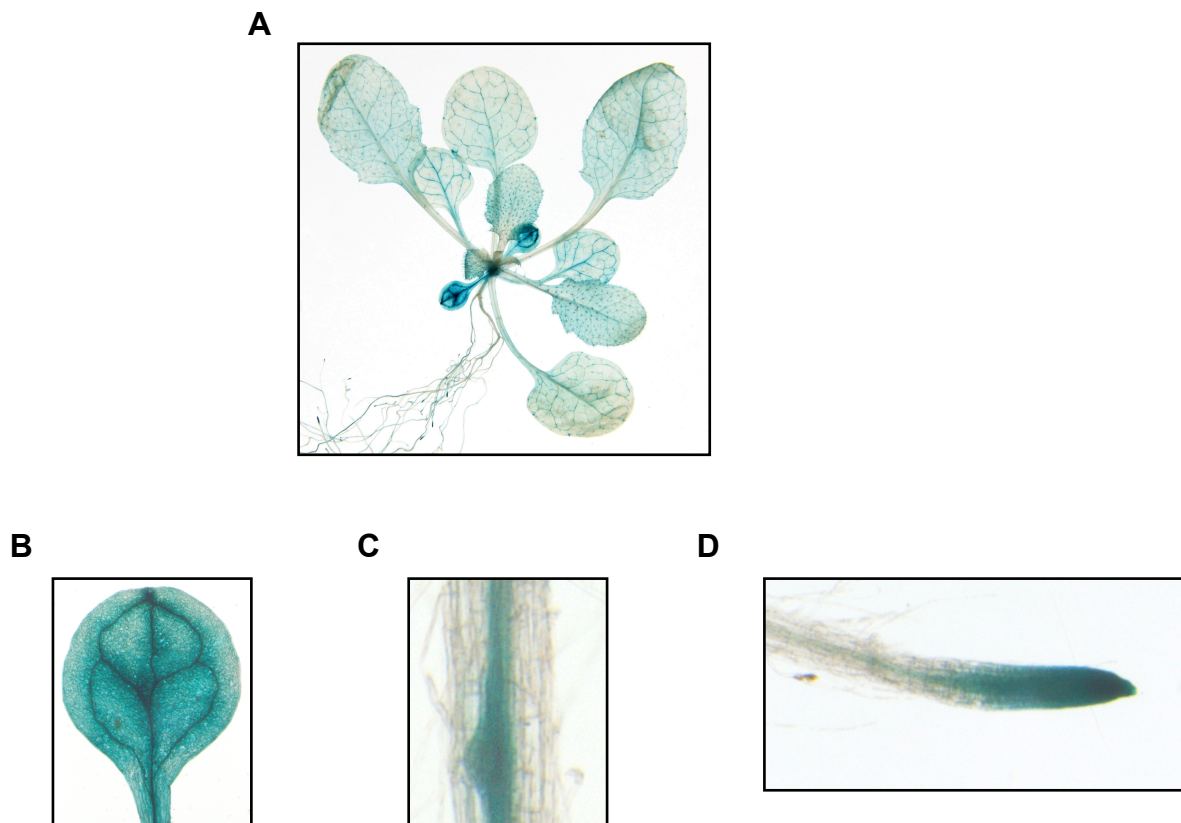


図 3.10 *PJAX1-GUS* 形質転換植物における GUS 発現の詳細観察

図 3.5 で示された *PJAX1-GUS* 形質転換 Col-0 の植物体全体 (A)、子葉 (B)、ステム (C)、根端分裂組織 (D) の写真。

3.3.4 異なる科の植物 *N. benthamiana* においても JAX1 はウイルス感染を強く阻害する

N. benthamiana は PIAMV の宿主植物の一つである。一般的な *R* 遺伝子は単離された植物と異なる科の植物では抵抗性を示さない (Narusaka et al., 2013)。そこで、シロイヌナズナの抵抗性遺伝子である *JAX1* が異なる科の植物である *N. benthamiana* においても PIAMV への抵抗性を付与するかを調べた。

まず、35S プロモーターにより全身で恒常的に *JAX1* を発現する形質転換 *N. benthamiana* (*P35S-FLAG-JAX1*) を作出した。ここでは *JAX1* タンパク質に FLAG ペプチドタグを付加したコンストラクトを用いた。得られた形質転換体 2 ライン (line 3, line 11) について PCR および抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロット解析により *JAX1* がゲノムに挿入され発現していることを確かめた (図 3.11BC)。次に、形質転換体の抵抗性を調べた。コントロールとして非形質転換 *N. benthamiana* に PIAMV-GFP を接種したところ、接種 20 日後に接種葉および上位葉で GFP 蛍光が観察され、PIAMV-GFP の全身感染が確かめられた (図 3.11A)。これに対し、*P35S-FLAG-JAX1* では PIAMV-GFP を接種し 20 日後に観察したところ、line 3, line 11 ともに接種葉においても上位葉においても蛍光は観察されなかった。このことは *JAX1* によって PIAMV-GFP の感染が阻害されたことを示していた。以上より、*JAX1* は異なる科の植物である *N. benthamiana* に対しても PAMV に対する強い抵抗性を付与することが示された。

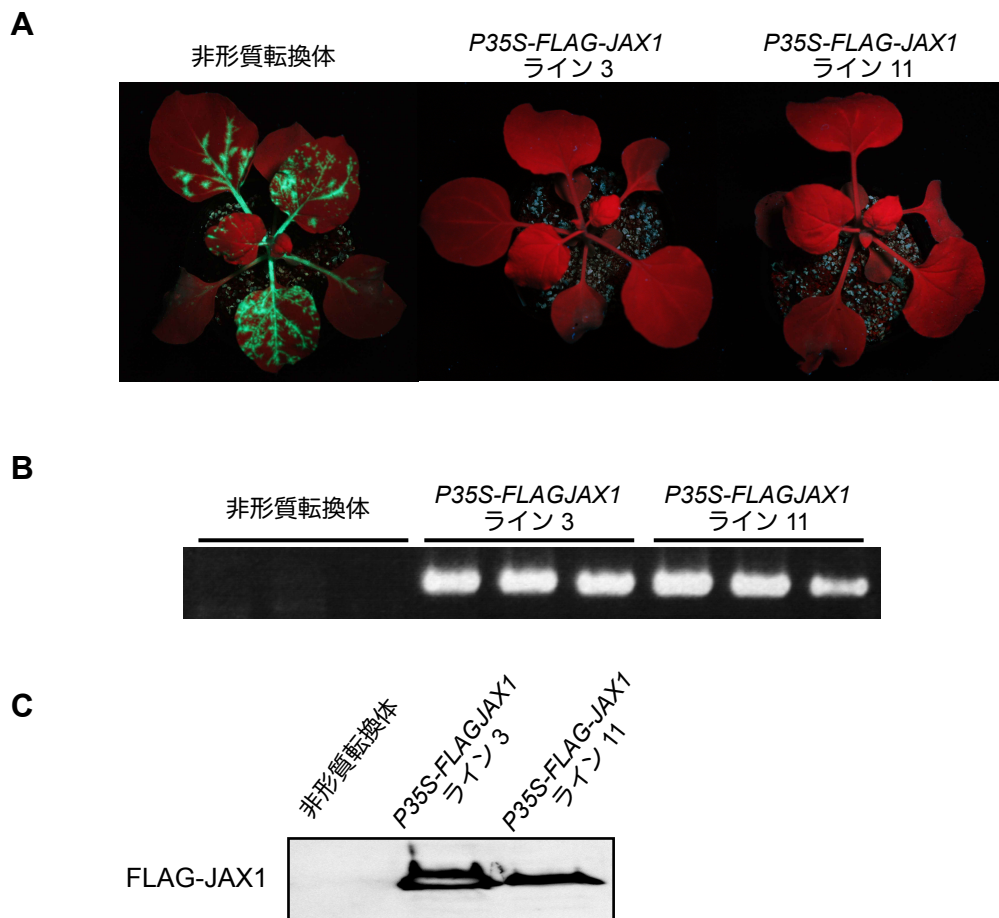


図 3.11 JAX1 形質転換 *N. benthamiana*

(A) JAX1 形質転換 *N. benthamiana* における PIAMV-GFP の感染阻害。非形質転換植物および *35S-JAX1* 形質転換植物の 2 ラインに PIAMV-GFP を接種した。

接種 20 日後に UV 照射下で観察した。GFP 蛍光はウイルス感染を示す。

(B) 形質転換植物での *JAX1* 遺伝子の確認。非形質転換植物および *P35S-FLAG-JAX1* 形質転換植物の 2 ライン (ライン 3、ライン 11) から抽出した全 DNA に対し *JAX1* 特異的プライマーを用いて PCR し、*JAX1* を増幅した。

(C) 形質転換植物での *JAX1* の発現。非形質転換植物および *P35S-FLAG-JAX1* 形質転換植物の 2 ラインから抽出した全タンパク質に対し抗 FLAG 抗体を用いてウェスタンブロット解析した。

3.3.5 JAX1 はウイルス蓄積を細胞レベルで阻害する

P35S-JAX1 形質転換シロイヌナズナおよび *N. benthamiana* において、*JAX1* を高発現させた場合に、接種葉においてもウイルス感染が強く阻害されることが示された (図 3.8AB、3.11)。そこで、*JAX1* は PIAMV 感染を早い段階で阻害するかを調べた。まず、*JAX1* を *N. benthamiana* の葉でアグロインフィルトレーション法を用いて一過的に発現することで、接種葉における PIAMV 感染への影響を調べた。コントロールとして PIAMV-GFP と pEarleyGate100 (vector control) をアグロインフィルトレーション法により共発現した場合、接種 5 日後に接種葉で GFP 蛍光が観察され PIAMV が蓄積していることが示された (図 3.12A)。これに対し、PIAMV-GFP と p35S-JAX1 を共発現した葉では GFP 蛍光は全く観察されなかった。ノーザンブロット解析によってウイルス RNA の蓄積を検出したところ、vector control を共発現した葉ではウイルス RNA の蓄積が検出されたのに対し、p35S-JAX1 を共発現した葉では検出されなかった (図 3.12B)。*JAX1* の発現はウェスタンブロット解析によって検出された (図 3.12C)。以上の結果から PIAMV-GFP の蓄積は *JAX1* によって接種葉で強く阻害されることが示された。さらに *JAX1* のネイティブプロモーターにより *JAX1* を一過的に発現したときにも接種葉でのウイルス蓄積はやや抑えられた (図 3.13)。以上の結果と、Bay-0 において PIAMV-GFP を機械的に接種した際、ウイルス感染が接種葉で阻害されていたことから (図 3.4B)、*JAX1* は PIAMV 感染の初期段階を阻害していると考えられた。

次に単一細胞におけるウイルス蓄積に対する *JAX1* の影響を調べるために、*JAX1* を導入したシロイヌナズナのプロトプラストにおける PIAMV の蓄積を調べた。シロイヌナズナ (Col-0) の培養細胞からプロトプラストを調整し、PIAMV-GFP プラスミドと共に、vector control (pEarleyGate100)、pJAX1-JAX1、あるいは p35S-JAX1 プラスミドを遺伝子導入した。導入 2 日後、vector control と共に PIAMV-GFP を導入したプロトプラストでは GFP 蛍光が観察され、pJAX1-JAX1 を導入したプロトプラストでは vector control の区よりも弱い蛍光が観察された (図 3.14A)。さらに p35S-JAX1 を導入したプロトプラストでは顕著に蛍光が弱まっていた。リアルタイム RT-PCR 解析により PIAMV-GFP の RNA 蓄積への *JAX1* 影響を解析したところ、vector control を導入した区に比べ、pJAX1-JAX1 導入区では 45 ~ 65%、p35S-JAX1 導入区では 10%に PIAMV-RNA の蓄積量が抑えられていた (図 3.14B)。さらに、*JAX1* によるウイルス蓄積阻害を RNA サイレンシングによる蓄積阻害と比べた。PIAMV-GFP へのサイレンシングを誘導するために、35S プロモーター下に GFP の逆方向反復配列を備え、GFP の二本鎖 RNA を発現する pIR-GFP ベクターを用いた。この二本鎖 RNA によって RNA サイレンシングが誘導され、GFP 配列を含む RNA が分解される (Senshu et al., 2009)。プロトプラストに PIAMV-GFP と pIR-GFP を導入し、*JAX1* を導入した場合とウイルス蓄積阻害の程度を比べた (図 3.14AB)。その結果、p35S-JAX1 導入区の方が pIR-GFP 導入区よりもウイルス蓄積量が減少していた。*JAX1* も *IR-GFP* も同じ 35S プロモーターで転写されていることを考慮すると、このことは

JAX1 によるウイルス蓄積阻害効果の方が二本鎖 RNA による阻害効果よりも強いことを示すと考えられた。以上の結果より、JAX1 は細胞レベルでウイルス蓄積を強く阻害することが示された。

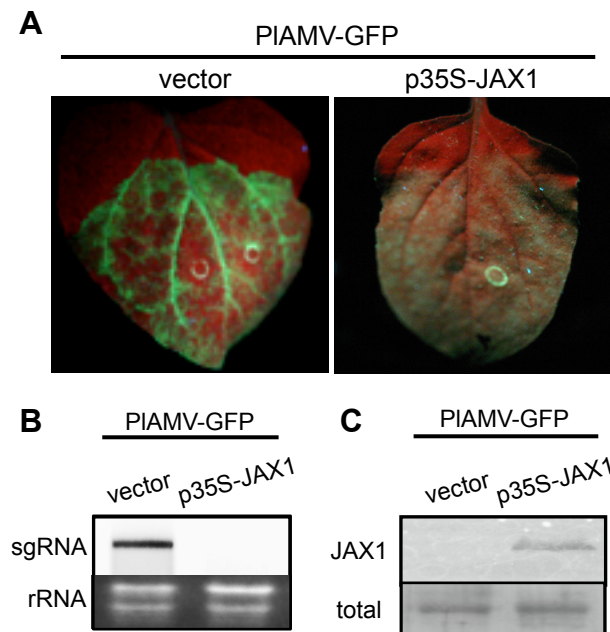


図 3.12 *N. benthamiana* 接種葉での JAX1 によるウイルス感染阻害

(A) JAX1 を発現した *N. benthamiana* の葉における PIAMV-GFP の蛍光。アグロインフィルトレーション法により PIAMV-GFP と共に vector control もしくは JAX1 を共発現した。vector control は pEarleyGate100 を用いた。接種 5 日後に UV 照射下でウイルス蓄積を示す GFP 蛍光を観察した。

(B) インフィルトレーション葉における PIAMV-GFP RNA の蓄積。(B) のインフィルトレーション葉より抽出した全 RNA に対し PIAMV CP の cDNA をプローブとしてノーザンブロット解析を行い、ウイルス RNA のプラス鎖を検出した。rRNA をエチジウムブロマイド染色し、ローディングコントロールとした。

(C) インフィルトレーション葉における JAX1 の蓄積。(B) のインフィルトレーション葉より抽出した全タンパク質に対し抗 FLAG 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。全タンパク質を CBB 染色し、ローディングコントロールとした。

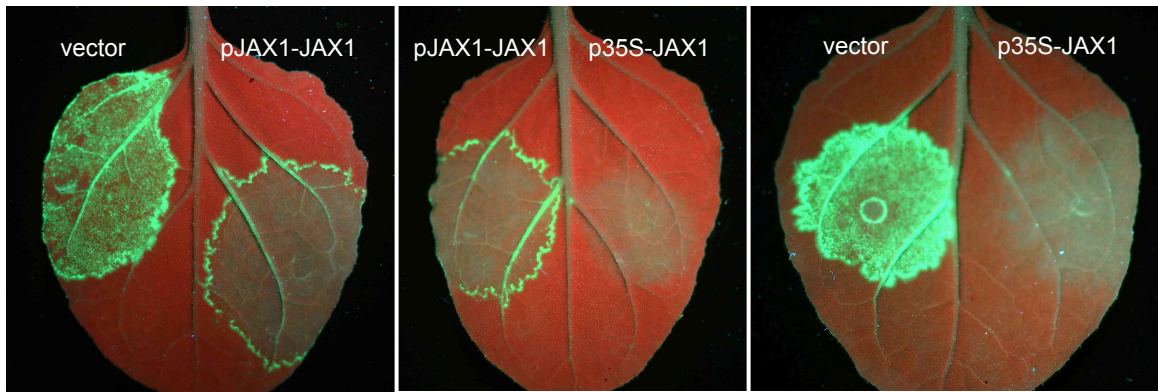


図 3.13 *N. benthamiana* の葉で JAX1 ネイティブプロモーターにより JAX1 を発現したときのウイルス蓄積阻害

N. benthamiana の葉にアグロインフィルトレーションにより PIAMV-GFP と vector control、PJAX1-JAX1 もしくは P35S-JAX1 を共発現した。pJAX1-JAX1 に対する vector control は pCambia1301 を、p35S-JAX1 に対する vector control は pEarleyGate100 を用いた。接種 5 日後にウイルス蓄積を示す GFP 蛍光を UV 照射下で観察した。

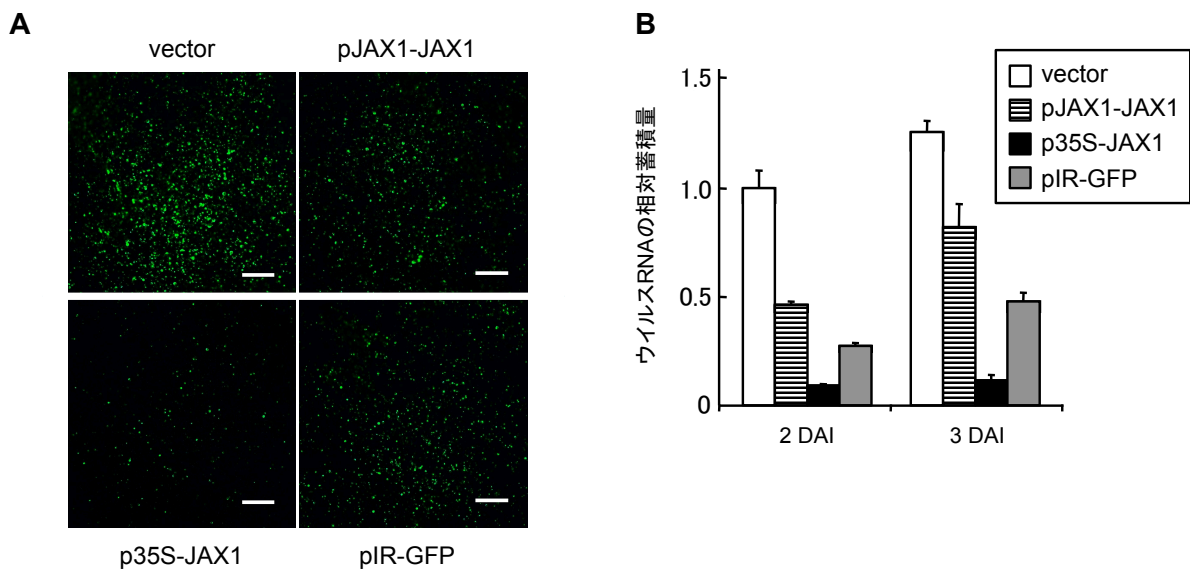


図 3.14 プロトプラストにおける JAX1 抵抗性によるウイルス蓄積阻害

(A) JAX1 発現プロトプラストにおける PIAMV-GFP 蛍光強度の低下。PIAMV-GFP と vector control、pJAX1-JAX1、p35S-JAX1 もしくは pIR-GFP を含む混合 DNA を、Col-0 の懸濁培養細胞から調整したプロトプラストに導入した。vector control は pEarleyGate100 を用いた。pJAX1-JAX1 および p35S-JAX1 はそれぞれ JAX1 のネイティブプロモーターおよび 35S プロモ

ーターの制御下で JAX1 を発現する。pIR-GFP は GFP の逆方向反復配列を発現し、GFP の RNA サイレンシングを誘導する。接種 2 日後に蛍光実体顕微鏡でウイルス蓄積を示す GFP 蛍光を観察した。スケールバーは 100 μm を示す。

(B) ウイルス RNA のリアルタイム RT-PCR 解析。接種 2 日もしくは 3 日後のプロトプラストより全 RNA を抽出し、CP 特異的プライマーを用いたリアルタイム RT-PCR を行った。PIAMV RNA 蓄積量は各サンプルのアクチン mRNA の蓄積量で標準化した。vector control 発現プロトプラストにおける PIAMV-GFP の RNA 蓄積量の平均値を基準 (1.0) に相対蓄積量を示した。エラーバーは標準偏差を示す。

3.3.6 JAX1 抵抗性は他のウイルス抵抗性と機構が異なる

JAX1 抵抗性の機構を調べるために、JAX1 抵抗性を他のウイルス抵抗性反応と比較した。まず、NLR 型の抵抗性遺伝子による抵抗性反応と比較するために、細胞死などの NLR 抵抗性反応の特徴が JAX1 抵抗性にも観察されるかを調べた。NLR による抵抗性のポジティブコントロールとして、cucumber mosaic virus の yello strain (CMV[Y]) に対する抵抗性遺伝子 *RCY1* による抵抗性を用いた (Takahashi et al., 2004)。*RCY1* はシロイヌナズナのエコタイプ C24 が有する CMV (Y) に対する抵抗性遺伝子で、NLR 型のタンパク質をコードしている。細胞死を検出するために、CMV (Y) を C24 に接種し、4 日後に接種葉をトリパンブルー染色した。その結果、CMV (Y) 接種葉は顕著に青色を呈した。しかしながら、PIAMV-GFP を接種した Col-0 および Bay-0 の接種葉ではトリパンブルーによる染色は観察されなかった (図 3.15A)。このことは、JAX1 抵抗性は細胞死を伴わないことを示していた。次に、NLR 抵抗性反応に特徴的な過酸化水素 (H_2O_2) の蓄積を検出する DAB 染色を行った。C24 の CMV (Y) 接種葉では顕著に褐色を呈したが、Col-0 および Bay-0 の PIAMV-GFP 接種葉では全く染色されなかった (図 3.15B)。このことは JAX 抵抗性では H_2O_2 が蓄積しないことを示していた。次に、抵抗性関連遺伝子である *PR-1* の発現パターンを解析した。*PR-1* はシロイヌナズナにおける NLR による抵抗性反応の代表的なマーカー遺伝子である (Kachroo et al., 2000)。*PR-1* 特異的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、C24 の CMV (Y) 接種葉では *PR-1* の転写産物が蓄積していたが、Col-0 および Bay-0 の PIAMV-GFP 接種葉においては蓄積していなかった (図 3.15C)。このことは JAX1 抵抗性では *PR-1* が誘導されないことを示していた。以上の結果より、NLR 抵抗性で誘導される反応は JAX1 抵抗性では起こらないことが示唆された。

植物ホルモンは植物の発生過程を司るシグナル分子であるが、そのうちのいくつか、特にサリチル酸、ジャスモン酸、エチレンは植物免疫においても重要な役割を果たしている (Bari and Jones, 2009)。JAX1 抵抗性においてもこれらの植物ホルモンを介したシグナル経路が働いているかを調べるために、SA 欠損変異体 (*eds5-1*)、ET 非感受性変異体 (*ein2-1*)、JA 非感受性変異体 (*jar1-1*)、と Bay-0 を交配し、PIAMV-GFP を接種した。その結果、*JAX1* を有するこれらの変異体 (*eds5-1/JAX1*, *ein2-1/JAX1*, and *jar1-1/JAX1*) のいずれも PIAMV-GFP は全身感染しなかったことから (表 3.3)、JAX1 抵抗性はこれらの変異の影響を受けないことが示された。よって JAX1 抵抗性はサリチル酸、エチレン、ジャスモン酸を介したシグナル経路非依存的な抵抗性機構を持つことが示唆された。

RNA サイレンシングも重要な植物のウイルス抵抗性である。RNA サイレンシングによるウイルス抵抗性機構ではウイルス RNA を認識してこれを分解する。RNA サイレンシングは HR 非依存的であり、細胞レベルのウイルス蓄積を強く阻害する。そこで、JAX1 抵抗性機構と RNA サイレンシング機構の関係を調べた。もし JAX1 抵抗性が RNA サイレンシング

機構の一部であれば、JAX1 抵抗性は RNA サイレンシングサブレッサーによって抑制される。PIAMV-GFP を IR-GFP と共に *N. benthamiana* の葉にアグロインフィルトレーション法により共発現した場合、GFP 蓄積は観察されなかった (図 3.16)。ここに、さらに TBSV のサイレンシングサブレッサーである p19 を共発現した場合は GFP 蛍光が観察されることから、サイレンシングによるウイルス蓄積阻害が p19 により妨げられることを示している。同様に PIAMV-GFP と JAX1、さらに p19 を共発現した場合は、p19 を発現しなかった場合と同様に GFP 蛍光が観察されなかった。以上の結果より、JAX1 抵抗性は siRNA により引き起こされる RNA サイレンシング機構非依存的な機構を持つことが示唆された。

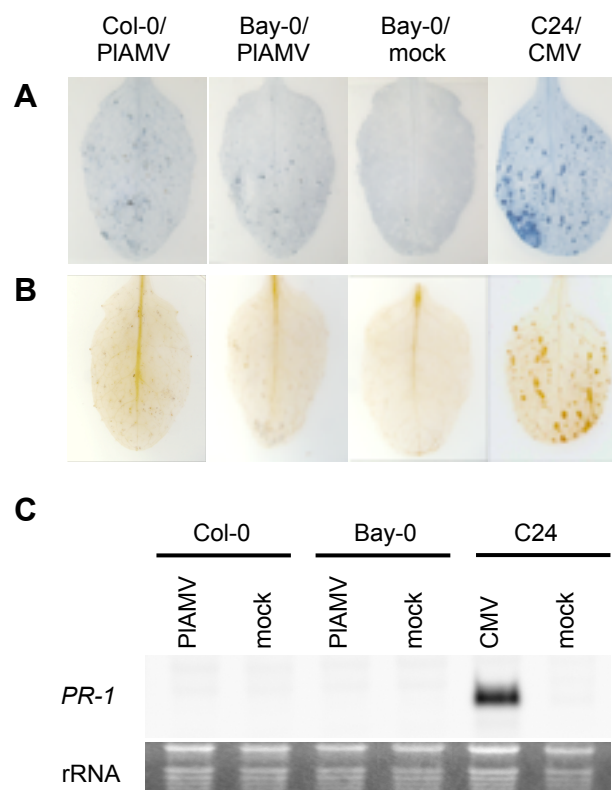


図 3.15 JAX1 抵抗性は NLR 抵抗性と特徴が異なる

(A) トリパングルー染色による死細胞の検出。Col-0、Bay-0 の PIAMV 接種葉およびコントロールとしてバッファーのみ接種した植物 (mock) を接種 4 日後にトリパングルー染色し、死細胞を観察した。ポジティブコントロールとしてシロイヌナズナのエコタイプ C24 に CMV を接種し、トリパングルー染色した。C24 は CMV に対する NLR 型の R 遺伝子、RCY1 を有する。

(B) DAB (3,3'-diaminobenzidine) 染色による H₂O₂ の検出。(A) の 4 日後の接種葉に DAB 溶液を浸潤した。ポジティブコントロールの CMV 接種 C24 の葉が褐色を呈し始めた時点で染色反応を止めた。

(C) PR-1 遺伝子のノーザンブロット解析。Col-0、Bay-0 の mock および PIAMV 接種植物から

接種 4 日後に全 RNA を抽出した。PR-1 特異的 cDNA プローブを用いたノーザンブロット解析により PR-1 の転写産物を検出した。rRNA をエチジウムブロマイド染色し、ローディングコントロールとした。

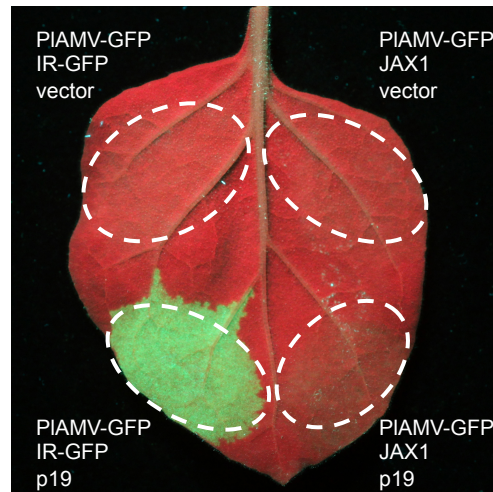


図 3.16 JAX1 抵抗性は RNA サイレンシングサプレッサーによって影響を受けない

N. benthamiana の葉にアグロインフィルトレーションにより PIAMV-GFP と図に示された各ベクターを共発現した。p19 は TBSV が有する強力なサイレンシングサプレッサーである。接種 4 日後にウイルス蓄積を示す GFP 蛍光を UV 照射下で観察した。白い点線はインフィルトレーションパッチ。

3.3.7 JAX1 はポテックスウイルスに対する広域な抵抗性を付与する

JAX1 により PIAMV 以外のウイルスに対する抵抗性が付与されるかを調べた。表 3.6 に挙げた様々なウイルス属のウイルスを図 3.11A で示した *P35S-JAX1* 形質転換 *N. benthamiana* に接種し、全身感染するかを調べた。ポテックスウイルスである PVX、WCIMV、AV3 を接種したところ、接種 20 日後において病徴は観察されず、接種葉および上位葉からもウイルス RNA は検出されなかった (表 3.6)。ポテックスウイルス以外の属のウイルス (TMV, CMV, TRV, TuMV, TEV, PVY, and RaMV) を接種したところ、接種 20 日後において各々のウイルスに特徴的な病徴を呈しており、接種葉および上位葉からウイルス RNA の蓄積が検出された。以上の結果より、*P35S-JAX1* 形質転換 *N. benthamiana* は接種した全てのポテックスウイルスに対して抵抗性であるが、他属のウイルスには感受性であることが示され、*JAX1* は広くポテックスウイルス属のウイルスに対する抵抗性を付与することが示唆された。

PVX に対する Rx 抵抗性は PVX の CP により誘導される動的抵抗性であるが、一度誘導されると PVX とは関係のない CMV に対しても効果がある (Kohm et al., 1993)。*JAX1* 抵抗性がポテックスウイルスの接種により誘導された条件下で他属のウイルスに対して抵抗性を発揮するかを調べるために、Bay-0 に RaMV と PIAMV を共接種し、RaMV 感染が阻害されるかを検証した。接種 20 日後、上位葉から PIAMV の RNA は検出されなかった一方で RaMV の RNA は検出されたことから、RaMV が Bay-0 に全身感染したことが示された (図 3.17A)。さらに *JAX1* 抵抗性が全身感染を妨げない程度に RaMV 感染に影響を与えていないか調べるために、接種葉での RaMV RNA の蓄積量をリアルタイム RT-PCR で解析したところ、PIAMV との共接種区と単独接種区で差は認められなかった (図 3.17B)。以上の結果より、*JAX1* 抵抗性はポテックスウイルスの感染条件下においても RaMV 感染にほとんど影響を与えないことが示された。

最後に、*JAX1* 抵抗性を RTM1 抵抗性と比較した。*JAX1* は PIAMV の蓄積を細胞レベルで阻害することが示された。RTM1 抵抗性は TEV の長距離移行を妨げることが示されているのみでその詳細な機構は不明である (Chisholm et al., 2001)。そこで、PIAMV に対する *JAX1* 抵抗性と TEV に対する RTM1 抵抗性を比較した。PIAMV-GFP と *JAX1* を *N. benthamiana* の葉にアグロインフィルトレーション法により一過的に共発現した場合、4 日後において GFP 蛍光は観察されなかった (図 3.18A)。一方で、TEV-GFP を *RTM1* と共発現した場合には 4 日後において蛍光が観察された。リアルタイム RT-PCR 解析およびウェスタンブロット解析の結果と合わせて、RTM1 はこの系において TEV の感染を阻害し得ないことが示された (図 3.18B)。また、PIAMV-GFP と *RTM1* の共発現区では蛍光が観察され、TEV-GFP と *JAX1* の共発現区でも蛍光が観察されたことから、PIAMV は *RTM1* の影響を受けず、TEV は *JAX1* の影響を受けないことが示された。以上の結果より、*JAX1* 抵抗性と RTM1 抵抗性はウイルス感染阻害機構の作用点が異なることが示唆された。

表 3.6 JAX1 抵抗性は広域なポテックスウイルスに対して特異的な抵抗性を示す

ウイルス種	ウイルス属	非形質転換体		JAX1 形質転換体	
		接種葉	上位葉	接種葉	上位葉
PVX	<i>Potexvirus</i>	+	+	-	-
WCIMV	<i>Potexvirus</i>	+	+	-	-
AV3	<i>Potexvirus</i>	+	+	-	-
TMV	<i>Tobamovirus</i>	+	+	+	+
CMV	<i>Cucumovirus</i>	+	+	+	+
TRV	<i>Tobravirus</i>	+	+	+	+
TuMV	<i>Potyvirus</i>	+	+	+	+
TEV	<i>Potyvirus</i>	+	+	+	+
PVY	<i>Potyvirus</i>	+	+	+	+
RaMV	<i>Comovirus</i>	+	+	+	+

いくつかの属の植物ウイルスを非形質転換 *N. benthamiana* あるいは JAX1 形質転換 *N. benthamiana* に接種した。接種 20 日後に、それぞれのウイルスに対する特異的プライマーを用いて RT-PCR し、ウイルス蓄積の有無を判定した。+、ウイルス特異的増幅産物が検出された；-、増幅が検出されなかった。

PVX; potato virus X、WCIMV; white clover mosaic virus、AV3; asparagus virus 3、TMV; tobacco mosaic virus、CMV; cucumber mosaic virus、TRV; tobacco rattle virus、TuMV; turnip mosaic virus、TEV; tobacco etch virus、PVY; potato virus Y、RaMV; radish mosaic virus

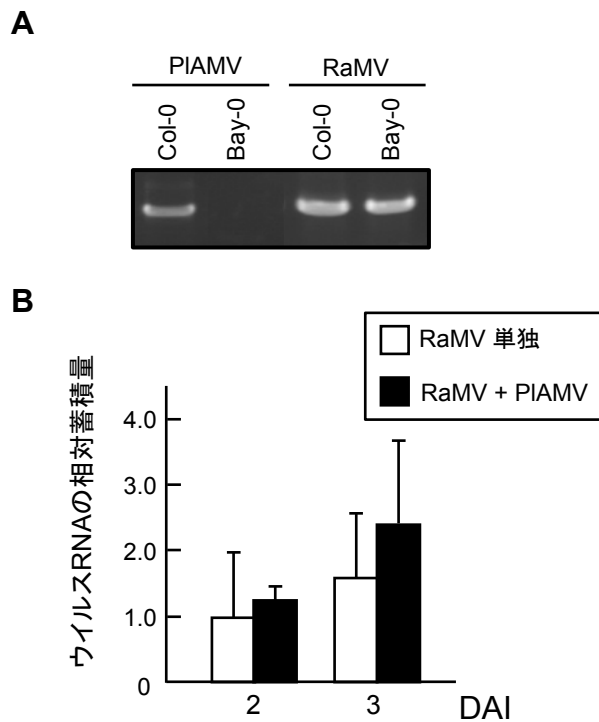


図 3.17 JAX1 発現植物における PIAMV と RaMV の共接種実験

(A) Bay-0 における PIAMV との共接種時の RaMV 全身感染。アグロインフィルトレーション法により PIAMV と RaMV を Col-0 および Bay-0 に共接種した。接種 20 日後に上位葉から抽出した RNA に対し、PIAMV および RaMV 特異的プライマーを用いて RT-PCR した。

(B) Bay-0 における PIAMV との共接種時の RaMV 蓄積。Bay-0 に RaMV を単独接種もしくは RaMV と PIAMV を共接種した。接種 2 日もしくは 3 日後に接種葉から抽出した全 RNA に対し RaMV 特異的プライマーを用いてリアルタイム RT-PCR によりウイルス量を測定した。アクチン mRNA の蓄積量を内部標準とした。接種 2 日後に RaMV 単独接種した接種葉における RaMV 蓄積量の平均を基準 (1.0) として、相対蓄積量を示した。エラーバーは標準偏差を示す。接種 2 日後においても 3 日後においても、RaMV 単独接種区と RaMV と PIAMV の共接種区において RaMV の RNA 蓄積量に有為差は無かった ($P > 0.05$)。

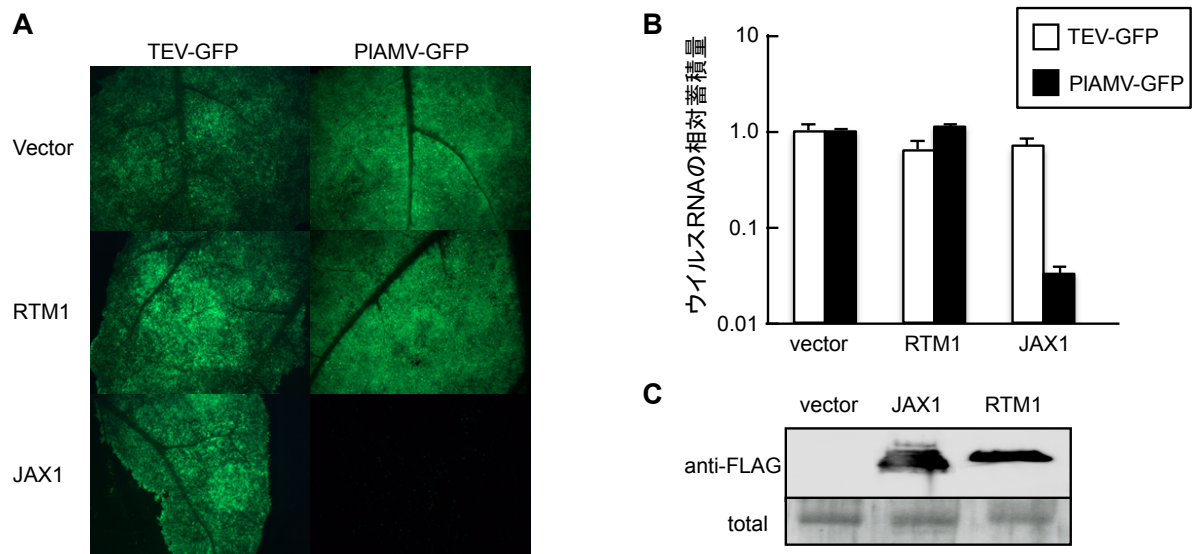


図 3.18 JAX1 抵抗性と RTM1 抵抗性の比較

(A) TEV-GFP、PIAMV-GFP の RTM1 もしくは JAX1 共発現時の蛍光。TEV-GFP (左)、PIAMV-GFP (右) と vector control (上段)、RTM1 (中段) もしくは JAX1 (下段) を発現するバイナリベクターを *N. benthamiana* の葉にアグロインフィルトレーションした。接種 4 日後 UV 照射下でウイルス蓄積を示す GFP 蛍光を観察した。

(B) インフィルトレーションパッチにおけるウイルス RNA の蓄積。(A)のインフィルトレーションパッチから抽出した全 RNA に対し、GFP 特異的プライマーを用いてリアルタイム RT-PCR 解析を行った。ウイルス RNA の蓄積量は各サンプルの eEF1A mRNA 蓄積量で標準化した。vector control と共発現した区の TEV-GFP または PIAMV-GFP の RNA 蓄積量を基準 (1.0) として相対蓄積量を示した。エラーバーは標準偏差を示す。

(C) インフィルトレーションパッチにおける JAX1 および RTM1 の蓄積。(A)で TEV-GFP と vector control、JAX1 あるいは RTM1 をアグロインフィルトレーションしたパッチより抽出した全タンパク質に対し、抗 FLAG 抗体を用いてウェスタンブロット解析した。同様の結果は PIAMV-GFP と vector control、JAX1 あるいは RTM1 をインフィルトレーションしたパッチからも得られた。全タンパク質を CBB 染色し、ローディングコントロールとした。

3.4 考察

本研究では植物ウイルスに対する抵抗性を付与する新たなレクチン遺伝子を同定した。これまで 10 種類以上の抗植物ウイルス優性抵抗性遺伝子が単離されているにもかかわらず、そのほとんどは NLR 型のタンパク質をコードする遺伝子である (Fraile and García-Arenal, 2010)。RTM1 はポテトウイルスへの抵抗性を司る遺伝子で、初の植物ウイルス抵抗性レクチン遺伝子として単離されたが (Chisholm et al., 2000)、それ以来 10 年以上にわたって新たな植物ウイルス抵抗性レクチン遺伝子は単離されず、植物免疫におけるレクチンの重要性は不明なままであった。本研究ではポテトウイルスとは全く異なるポテックスウイルスを標的とするレクチン抵抗性遺伝子 JAX1 が同定された。また、JAX1 は RTM1 とは異なるウイルスの感染段階を阻害することも示された。抵抗性の標的や、阻害する感染段階の異なるレクチン遺伝子が存在することが示されたことで、植物ウイルスに対するレクチン抵抗性 (lectin-mediated resistance; LMR) の普遍性が強く示唆される。

3.4.1 植物ウイルスに対するレクチン抵抗性

JAX1 を有する抵抗性シロイヌナズナエコタイプにおいてウイルス蓄積が接種葉で抑制されることが示された。PIAMV-GFP を Bay-0 に機械的に接種すると、ウイルスの感染は少数の局所的な感染斑内 (local infection foci) に抑えられ、ウイルス RNA の蓄積量は Col-0 における蓄積量と比べて著しく少なかった (図 3.4)。しかし、アグロインフィルトレーション法によって PIAMV-GFP を Bay-0 もしくは PJAX1-JAX1 形質転換植物に接種すると、ウイルス蓄積量は Col-0 における蓄積量と差がなかった (図 3.3, 3.8)。このような蓄積量の違いはアグロインフィルトレーション法によるウイルス接種は接種圧が極めて高いということに起因していると考えられる (Bendahmane et al., 2000)。すなわち、Bay-0 および PJAX1-JAX1 形質転換植物の接種葉における JAX1 抵抗性が一部、高い接種圧によって打破されている可能性がある。ポテックスウイルスは接触伝搬されることから、機械的接種によって観察された Bay-0 での抵抗性の表現型が JAX1 の本来の機能を反映したものであると考えられる。

本研究では、JAX1 抵抗性と RTM1 抵抗性でウイルス感染阻害の作用が異なることも示した。PIAMV-GFP を機械的に接種した際、Bay-0 の接種葉における蛍光斑の数と大きさは感受性エコタイプにおけるものよりも少なく小さかった (図 3.4)。これに対し、GUS 発現 TEV を RTM1 を有するエコタイプ Col-0 に機械的に接種した際の感染斑の数と大きさは、感受性エコタイプ C24 に接種した際と比べて差がなかった (Mahajan et al., 1998)。さらに、アグロインフィルトレーション法による *N. benthamiana* 葉上での一過的発現系においても、JAX1 は PIAMV-GFP の蓄積を接種葉で阻害する一方、RTM1 は TEV-GFP の蓄積に影響を与えなかった (図 3.18)。また、プロトプラストを用いた実験により JAX1 は細胞レベルのウイルス蓄積を阻害すること

が示され (図 3.14)、RTM1 は長距離移行を阻害することから (Chisholm et al., 2001)、JAX1 抵抗性と RTM1 抵抗性は異なるウイルス感染段階を阻害していると考えられる。

また、*JAX1* の植物体内における発現パターンを解析した。*JAX1* プロモーターによる GUS の発現は主に維管束細胞で観察されたが、葉肉細胞においても一定のレベルで発現していた (図 3.9BC)。*JAX1* プロモーターによる GUS の発現は根の維管束細胞および根端分裂細胞においても観察された (図 3.10)。しかし、*JAX1* 転写産物の蓄積は Bay-0 の根においては検出されなかった (図 3.9A)。この結果の相違は、Bay-0 において根特異的な *JAX1* 発現制御が他にも存在し、根における *JAX1* 発現を抑制していることに起因する可能性がある。

JAX1 抵抗性は細胞レベルでウイルス感染を阻害することが示された。細胞レベルの感染阻害を司る抵抗性遺伝子として *Rx* や *Tm-1* があるが、これらの遺伝子を有する植物は対象のウイルス感染を完全に抑える (Adams et al., 1986、Ishibashi et al., 2007)。*JAX1* も 35S プロモーターにより発現させたシロイヌナズナおよび *N. benthamiana* では、PIAMV-GFP の感染を接種葉レベルで完全に抑える (図 3.8、3.11)。さらに、シロイヌナズナプロトプラストにおいても 35S プロモーターにより発現させた *JAX1* はウイルス蓄積を完全に抑えた。よって *JAX1* は植物に高度抵抗性を付与するものであると言える。しかし、*JAX1* をネイティブプロモーターにより発現させた植物は PIAMV-GFP のアグロインフィルトレーションによる接種に対して、接種葉での蓄積を抑えなかった (図 3.3、3.8)。また、*JAX1* はネイティブプロモーターで一過的に発現させた場合でも *N. benthamiana* の葉およびシロイヌナズナのプロトプラストにおいて PIAMV-GFP 感染に対してある一定の阻害効果を発揮するが、35S プロモーターによる発現時と比べるとその程度は弱い (図 3.13、14)。soybean mosaic virus (SMV) に対して高度抵抗性を付与する *Rsv1* による抵抗性でもこれと同じように条件によってはウイルス感染を完全に阻害しない現象が知られている (Hajimorad and Hill, 2001)。すなわち、*Rsv1* を有する大豆品種は SMV を機械的に接種した場合は SMV に対して完全に抵抗性となるが、接ぎ木により接種した場合には HR 様の病斑を生ずる。プロモーターによる *JAX1* 抵抗性の表現型の違いは、*JAX1* のネイティブプロモーターと 35S プロモーターで転写活性が違うことに起因していると考えられる。*JAX1* のネイティブプロモーターは主に維管束細胞で活性化することから、*JAX1* 抵抗性はウイルスが葉肉細胞に接種された場合はあまり影響を与えず、維管束に到達したときに強く感染を阻害する抵抗性である可能性がある。このことが原因で *JAX1* をネイティブプロモーターで発現させた場合は接種葉レベルではウイルスの感染を完全に阻害しないものと考えられる。また、*JAX1* の転写はウイルス接種による誘導を受けないため (図 3.9C)、ウイルスに対して十分な応答ができていない可能性もある。

3.4.2 植物ウイルスに対するレクチン抵抗性の普遍性

レクチンは植物のウイルス抵抗性において重要な役割を持っている可能性がある。同じレクチンである JAX1 と RTM1 はウイルスの異なる感染段階を阻害するが、このことは同じ NLR 型の複数の抵抗性遺伝子が異なる抵抗性作用機作を持つことに相当する。すなわち、多くの NLR 型の抵抗性遺伝子による抵抗性は HR を伴う組織レベルの抵抗性であるが、ジャガイモの 2 つの *Rx* 遺伝子 (*Rx1*, *Rx2*) と大豆の *Rsv1* による抵抗性は HR を伴わない細胞レベルの高度抵抗性である (Bendahmane et al., 1999, 2000, Hajimorad and Hill, 2001)。Rx および Rsv1 抵抗性は、HR が関わる抵抗性の活性因子である SGT1 および RAR1 を必要とすることから、これらの抵抗性と他の NLR 型抵抗性遺伝子による抵抗性との間には共通の機構があると考えられる (Peart et al., 2002, Liu et al., 2004, Fu et al., 2009)。異なる作用機作を有する JAX1 抵抗性と RTM1 抵抗性との間にも同じレクチン抵抗性遺伝子による抵抗性として、何かしら共通の機構が存在する可能性がある。さらに、JAX1 はシロイヌナズナの抵抗性遺伝子であるが、異なる科の植物である *N. benthamiana* でも PIAMV 感染を阻害した。このことはレクチンによるウイルス抵抗性機構が植物の科を超えて保存されている可能性を示唆している。以上より、植物ウイルスに対する LMR は NLR 型の遺伝子による抵抗性と同じように植物抵抗性において重要な位置を占めている可能性がある。

LMR は植物ウイルスに対して広いスペクトラムを持った抵抗性である可能性がある。JAX1 抵抗性は本研究に供試した全てのポテックスウイルスの感染を阻害した一方で、ポテックスウイルス属以外の属のウイルスの感染には影響を与えなかった。ポテックスウイルスとは系統的に遠縁な RaMV に対しては、PIAMV と共接種しても JAX1 抵抗性の影響はなかった (図 3.17)。これらの結果は JAX1 抵抗性がポテックスウイルス特異的な広域抵抗性であることを示している。これに対し、RTM1 はいくつかのポティウイルスに対して抵抗性を発揮し、他属のウイルスには抵抗性を発揮しない (Decroocq et al., 2006)。このように、ある属に対して広域な抵抗性を発揮することから、LMR は対象のウイルス属内で共有する共通パターンを標的として阻害している可能性がある。同様に、NLR 型抵抗性遺伝子による抵抗性も同じ属内のいくつかのウイルスに対して発揮される。*N* および *R* 遺伝子はそれぞれトバモウイルス属およびポテックスウイルス属のいくつかのウイルスに対して抵抗性を発揮するが、他属のウイルスには影響を与えない (Tobias et al., 1982, Baure's et al., 2008)。このことは 1 つの抵抗性遺伝子が特定のウイルスグループに対する抵抗性を担うことによって、植物が多様なウイルスに対して広く抵抗性を発揮している可能性を示唆している。現在までに同定されたウイルス抵抗性レクチンは RTM1 と JAX1 のみであるが、多くの抵抗性遺伝子座が多様な植物ウイルスに対して HR を伴わない抵抗性を司っていることから (Solomon-Blackburn and Barker, 2001, Kang et al., 2005)、この中には未同定のレクチン遺伝子が存在し抵抗性を発揮している可能性がある。

3.4.3 植物ウイルスに対するレクチン抵抗性の機構

レクチンは自己-非自己の認識分子と考えられているため、NLR 型の R タンパク質がウイルスを認識するように、レクチンも未知の機構によりウイルスを認識している可能性がある。シロイヌナズナはゲノム上に 48 のジャカリンレクチン遺伝子を有しているが、その 1 つである MBP (At3g16450) はいくつかの糖と特異的に相互作用する (Nagano et al., 2008、Takeda et al., 2008)。JAX1 および RTM1 は MBP とアミノ酸配列上、高い類似度を示すため、これらも糖と結合する可能性がある。このことと、動物の免疫系においてレクチンは糖鎖修飾されたタンパク質を認識し機能することを考えると (Fujita, 2002)、JAX1 と RTM1 も糖鎖修飾されたウイルスタンパク質を認識する可能性がある。実際に、PVX の CP の N 末端は糖鎖修飾されていることが示されている (Baratova et al., 2004)。plum pox virus (PPV) は RTM1 抵抗性により感染を阻害されるウイルスであるが (Decroocq et al., 2006)、PPV の CP の N 末端も糖鎖修飾されている (Fernández-Fernaández et al., 2002)。さらに、RTM1 抵抗性に対する PPV の Avr 領域は CP の N 末端であり、糖鎖修飾部位と重複していることから (Decroocq et al., 2009)、RTM1 抵抗性は糖鎖修飾された外被タンパク質を認識して発揮されている可能性がある。JAX1 も外被タンパク質もしくはその他の糖鎖修飾されたウイルスタンパク質との直接的な相互作用により、あるいは糖鎖修飾された宿主タンパク質を介して間接的にウイルスを認識している可能性がある。

動物の免疫系において、レクチンは病原体の PAMPs を認識して補体系を活性化したり、病原体をオプソニン化して食細胞に取り込まれやすくしたり、直接病原体を凝集して病原体を不活化したりする (Fujita, 2002)。さらに、レクチンの PAMPs 認識を起点として炎症性サイトカインやケモカインなどを含むシグナル経路が活性化する (Willment and Brown, 2008)。これら動物の免疫におけるレクチンの働きから類推すると、JAX1 抵抗性の作用機構の一つの可能性として、JAX1 がウイルスを認識し下流の抵抗性反応を引き起こすという機構が考えられる。JAX1 抵抗性は NLR 抵抗性で起こるような、HR や防御関連遺伝子の発現が起これず (図 3.15)、植物ホルモンを介さずに抵抗性を発揮していることから (表 3.3)、JAX1 は未知の抵抗性反応を引き起こしている可能性がある。RTM1 抵抗性でも、RTM1 の他に small heat shock 様タンパク質 RTM2 と MATH ドメインを持つ RTM3 が必要であることが示されている。これらの機能は未だ明らかになっていないが、RTM1 抵抗性はこれらの因子が関わるシグナル経路を介して発揮される可能性がある (Whitham et al., 2000、Cosson et al., 2010)。あるいは、ウイルスに直接結合し凝集していることも考えられる。JAX1 抵抗性は単一細胞においてウイルス感染を阻害することから、ウイルスの翻訳に関わる宿主因子もしくはウイルスの複製酵素を凝集させることでこれらを生不活化している可能性もある。

植物レクチンは動物細胞において動物ウイルスの感染を阻害する効果を発揮することが知られている (Balzarini et al., 1992、Cowan, 1999、Lam and Ng, 2011)。糖タンパク質は通常ウイルスのエンベロープ表面に露出していることから、植物レクチンはこれらのウイルス糖タンパク質

を認識し結合することで感染を阻害していると推測されている。このような植物レクチンによる動物レクチンの感染阻害能は、植物における植物ウイルスの感染阻害能に由来する可能性もある。植物ウイルスに対する LMR の普遍性が本研究により示されたことは、この考えを強く支持するものである。よって、LMR の機構を解明していくことは植物ウイルスに対する防御機構を解明するに留まらず、動物、植物に共通する免疫系の解明につながる可能性を持つ。

3.4.4 JAX1 抵抗性の作用機構についての今後の研究展開

本研究では、ポテックスウイルスに対する広範な抵抗性を付与するジャカリンレクチン遺伝子 *JAX1* を同定した。*JAX1* 抵抗性は細胞レベルでウイルス感染を阻害する高度抵抗性であり、その機構は NLR 抵抗性や同じジャカリンレクチンである *RTM1* による抵抗性とも異なることが示唆された。*Rx* 抵抗性が誘導されたプロトプラストではポテックスウイルス以外の他属のウイルスも蓄積できなくなることから、*Rx* 抵抗性は動的抵抗性で誘導された抵抗性は非特異的なものであると考えられている (Kohm et al., 1993)。これに対し、*Tm-1* 抵抗性は静的抵抗性であり、プロトプラストにおいて他属ウイルスの感染は阻害しない (Ishibashi et al., 2007)。本研究で *RaMV* と *PIAMV* を Bay-0 に対して共接種しても、*JAX1* 抵抗性は *RaMV* の感染を阻害できないことが示された (図 3.17)。このことは *JAX1* 抵抗性が *Tm-1* のような静的抵抗性であるか、あるいは動的抵抗性であるが誘導された抵抗性がポテックスウイルスに特異的に作用するものであることを示唆している。しかし、この系では *PIAMV* と同一細胞に感染していない *RaMV* が存在し、そのような *RaMV* が全身感染したことも考えられることから、プロトプラストにおいて同様の実験をする必要がある。また、*Tm-1* 抵抗性はタバコ無細胞抽出液 *BYL* (evacuolated tobacco protoplast extract) を用いた *in vitro* ウイルス翻訳/複製系においてウイルス複製を阻害することが示されている (Ishibashi et al., 2007)。*BYL* には核が存在しないため、動的抵抗性は発揮されないと考えられる。よって、この系を用いることでも *JAX1* が静的抵抗性であるか否かを明らかにすることができると考えられる。*JAX1* は細胞レベルでウイルスの蓄積を阻害することから、ウイルスの翻訳または複製を阻害していると考えられる。*BYL* を用いた *in vitro* 系では翻訳と複製を切り離して反応させることができる。この系を用いて *Tm-1* 抵抗性は複製を阻害していることを明らかにした。今後、*BYL* を用いて *JAX1* 抵抗性の作用点をより詳細に解析することで安定性の理由が明らかになれば、他のウイルスに対しても同じ作用点を標的とすることで、より効率的な防除対策を構築できると考えられる。

3.4.5 新たな抵抗性遺伝子の可能性

緒論で述べたように現在、抵抗性品種で利用されている植物ウイルスに対する *R* 遺伝子はほとんどが NLR 型のタンパク質をコードするものである。しかし、NLR 抵抗性は抵抗性のスペクトラムが狭いことが問題である。すなわち、本研究ではクリスマスローズのウイルス病を扱ったが、このようなマイナークロップのウイルス病は知られているだけでも数多く存在する上、研究

がなされていないために存在が知られていないウイルス病も多いと考えられる。このような個々のウイルスに対する抵抗性遺伝子の探索がなされるとは考えにくいいため、ウイルスに対する広域抵抗性の発見は強く求められるものである。

現在までに同定されている植物ウイルスに対する *R* 遺伝子は *NLR* がほとんどであるが、*Tm-1* の存在や本研究により *RTM1* に次いで *JAX1* が植物ウイルスの感染を阻害するジャカリンレクチンとして見出されたことは *NLR* 以外のウイルス抵抗性遺伝子が存在することを強く示唆している。本研究により、既存の *RTM1* に加えて *JAX1* という 2 つの異なるウイルス抵抗性ジャカリンレクチンの存在が証明され、レクチン抵抗性が植物ウイルス抵抗性の普遍的機構の一つであることが強く示唆された。このことから、植物にコードされるレクチン遺伝子から抵抗性遺伝子を探索することも有効な戦略の一つであると考えられる。また、最近になってジェミニウイルスである tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) に対する *R* 遺伝子 *Ty-1* は RNA サイレncing に関わる RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) をコードすることが明らかになった (Verlaan et al., 2013)。これらのことから、現存する植物遺伝子源の中には未知の抵抗性遺伝子が多数存在する可能性が考えられる。その中には PTI のように特異性が低く広域なウイルスに対して感染を阻害するような抵抗性が存在する可能性がある。実際に、*JAX1* 抵抗性はポテックスウイルスに対して広いスペクトラムを有することが明らかになり、近縁の属に対して抵抗性を有するかどうかこれから研究する必要があるが、このような広域な抵抗性が多く発見されれば、ウイルス病に対する防除対策の幅が広がる。新たな抵抗性遺伝子の探索を続けて行くことがウイルス病の被害の軽減に貢献することになるだろう。

摘要

植物病による作物生産の損失額は年間 600 億ドルに及ぶと考えられているが、その中でもウイルス病は菌類病に次いで 2 番目に大きな被害を与えている。しかし、ウイルスに対する有効な農薬はほぼ存在せず、現在植物が有する抵抗性を防除手段として利用しているが、ウイルス抵抗性の知見は乏しい。よって、個々のウイルスの性状・感染機構の知見を深めることに加え、植物の有する抵抗性研究を進展させることが有効な防除対策の確立に不可欠である。

このような背景の下、本研究ではまず我が国でクリスマスローズに発生した植物ウイルス病の診断を通して、その原因と考えられたベータフレキシウイルス科カルラウイルスの遺伝子構造を解析した。さらに、アルファフレキシウイルス科ポテックスウイルスに対する抵抗性遺伝子を探索し、高度抵抗性を司る新規抵抗性遺伝子 *JAX1* を同定した。

1 黒死病に感染したクリスマスローズより分離されたカルラウイルス

1.1 クリスマスローズに発生した病害の診断

東京都内の生産者より、クリスマスローズに発生した黒変症状について診断依頼があり調査を行った。症状を観察したところ、欧州諸国を中心に発生が確認されている **black death** 病の症状と酷似していた。被害植物の茎葉部は葉脈に沿ってすじ状に黒変、または黒色斑点が生じ、特に展開直後の新芽、新葉で顕著であった。また、がくにも同様のすじ状の黒変、黒色斑点が見られ著しく外観を損なっていた。罹病部からはクリスマスローズに感染して被害を及ぼす糸状菌や細菌は分離されなかった。一方で罹病部から抽出した粗汁液を電子顕微鏡観察した結果、ひも状のおよそ 600 ~ 900 nm のウイルス様粒子が観察された。そこで、米国で **black death** 病より分離されたカルラウイルス **helleborus net necrosis virus (HeNNV)** のゲノムを特異的に増幅可能なプライマーを用いて、RT-PCR による HeNNV の検出を試みた。その結果、特異的な約 400 塩基の DNA 断片が増幅された。増幅 DNA 産物の塩基配列を決定し、HeNNV 米国分離株の外被タンパク質部分配列と比較したところアミノ酸配列で 90%以上の高い相同性を示した。以上の結果から本罹病植物に対する HeNNV の感染が証明された。これは、日本における HeNNV の初発生確認である。罹病植物の症状および HeNNV が分離されたことをふまえ、クリスマスローズ **black death** 病の日本初発生を報告し、本病の和名として「クリスマスローズ黒死病」を提案した。

1.2 HeNNV 日本分離株の全ゲノム解析

HeNNV のゲノム性状に関する知見は極めて限られているため、本分離株 (J 株) の全長ゲノム塩基配列を決定し解析した。その結果、本分離株は 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 8,541 塩基であった。ドメイン解析と他のカルラウイルスとの比較解析の結果、ゲノム上には 6 つの ORF が存在し、それぞれ複製酵素 (RdRp)、移行タンパク質 (TGBp1~3)、外被タンパク質 (CP)、核酸結合タンパク質 (NABP) をコードしていた。

得られた配列情報を基に LAMP プライマーを作製し、簡易・迅速な診断系を確立した。

2 ポテックスウイルスに対する抵抗性遺伝子 *JAX1* に関する研究

植物のウイルス抵抗性機構を解明するために、新たなウイルス抵抗性遺伝子を探索した。*plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) はアルファフレキシウイルス科ポテックスウイルス属に属するウイルスであるが、本研究では PIAMV に対する抵抗性遺伝子の同定を試みた。

2.1 PIAMV 抵抗性シロイヌナズナエコタイプ

まず、シロイヌナズナのエコタイプ 45 種を対象に、PIAMV 抵抗性エコタイプのスクリーニングを行った。GFP を発現する PIAMV 感染性クローン (PIAMV-GFP) をアグロインフィルトレーション法により接種し、接種 20 日後に GFP 蛍光を観察することでウイルス感染を判定した。その結果、大部分のエコタイプに PIAMV-GFP が全身感染したのに対して、Bay-0、Dra-2、Eil-0、Ga-0、Is-1 の 5 つのエコタイプでのみ GFP 蛍光が接種葉でのみ観察され、上位葉で観察されなかった。この結果をウイルス RNA の蓄積によっても確かめるために、PIAMV 特異的プライマーを用いて RT-PCR を行った。その結果、接種葉からはウイルス RNA が検出されたが、上位葉からは検出されなかった。以上の結果から、これらの 5 エコタイプを PIAMV 抵抗性エコタイプと判定した。

次に、5 エコタイプのうちの Bay-0 に対して PIAMV 抵抗性の特徴を解析した。抵抗性の強さ等を正確に評価するために機械接種法により PIAMV-GFP を接種し、接種葉におけるウイルス蓄積量を解析し、蛍光斑の数を計測した。Bay-0 および PIAMV 感受性エコタイプ Col-0 に PIAMV-GFP を接種し、接種 20 日後に接種葉および上位葉より抽出した RNA に対して PIAMV 特異的プローブを用いたノーザンブロット解析を行った。その結果、Bay-0 の接種葉においてはウイルス RNA の蓄積が検出されたが、上位葉では蓄積は検出されなかった。しかし、Bay-0 接種葉におけるウイルス蓄積量は Col-0 の接種葉におけるウイルス RNA 蓄積量と比べて少なかった。また、接種葉における GFP 蛍光斑数を計測したところ、Col-0 に比べて Bay-0 では顕著に少なかった。以上の結果から、Bay-0 の PIAMV に対する抵抗性は、接種葉レベルで機能することが示唆された。

2.2 抵抗性遺伝子のマップベースクローニング

ウイルス抵抗性の遺伝学的基盤を明らかにするために、Bay-0 と Col-0 を交配しその子孫世代を用いて表現型の分離比分析を行った。F1 世代、F2 世代を用いた解析により、本抵抗性が単一優性遺伝子座によるものであることが示された。続いて F2 世代の PIAMV 感受性個体を用いたマッピング解析により、抵抗性遺伝子座を 1 番染色体長腕の約 130 kb の領域に絞り込んだ。抵抗性遺伝子を同定するために、TAIR データベースを参照し、当該領域に存在する遺伝子のアノテーションを調べた。このうちジャカリンレクチンをコードする At1g58160 に着目した。Col-0 および Bay-0 よりゲノム DNA を抽出し、At1g58160 の遺伝子配列を解析したところ、Bay-0 の遺伝子上には全長のジャカリンレクチンタンパク質がコードされているのに対し、Col-0 の遺伝子では途中で終止コドンが存在し偽遺伝子化していた。相補実験の結果、Bay-0 の

At1g58160により Col-0でPIAMV抵抗性が相補されたことから、本遺伝子が Bay-0のPIAMV抵抗性を司ることが示された。本遺伝子はジャカリンレクチンをコードすることから *jacalin-type lectin required for potexvirus resistance 1 (JAX1)* と名付けた。

2.3 JAX1 抵抗性の機構解析

JAX1の発現パターンを解析した。Bay-0においてPIAMV接種0、2、4日後でJAX1 mRNAの転写量は変動しなかった。よってJAX1の転写はウイルス感染による変動を受けないことが示された。JAX1の推定プロモーター領域とGUSを用いたレポーター解析により、主に維管束組織で発現していることが示された。

一般的な抵抗性遺伝子は単離された植物と異なる科の植物では抵抗性を示さない。異なる科の植物でJAX1がウイルスに対する抵抗性を付与するかを調べるために、35SプロモーターによってJAX1タンパク質を恒常発現する *Nicotiana benthamiana (P35S-JAX1)* を作出した。PIAMV-GFPを接種したところ、接種葉を含む植物体全体において全くウイルスの蛍光が観察されなかった。

上記の実験よりJAX1は接種葉レベルで強くウイルス感染を阻害していることが示された。さらに、JAX1が細胞レベルでウイルス感染に影響を与えるか調べるために、シロイヌナズナプロトプラストにPIAMV-GFPを接種した。その結果、JAX1をトランスフェクションしたプロトプラストではウイルス蓄積量が強く抑えられた。

さらに、既存のウイルス抵抗性反応とJAX1抵抗性を比較した。既存のウイルス抵抗性遺伝子による抵抗性では、抵抗性反応に活性酸素種の蓄積や過敏感細胞死を伴うが、種々の解析の結果、JAX1抵抗性ではこのような反応は伴わなかった。

最後に、JAX1抵抗性に感受性のウイルス範囲を調べるために *N. benthamiana* を宿主とする種々のウイルスをP35S-JAX1に接種したところ、ポテックスウイルスは感染を阻害されたが、ポティウイルスをはじめ、他属のウイルスは全身に感染した。

以上を要するに、JAX1は広くポテックスウイルスに対する抵抗性を付与し、細胞レベルで細胞死を伴わずにウイルス感染を完全に阻害する高度抵抗性を付与する抵抗性遺伝子であることが示された。

本研究ではベータフレキシウイルス科に属するカルラウイルスであるHeNNVの遺伝子構造を明らかにし、これを基に診断系を確立した。また、アルファフレキシウイルス科に属するポテックスウイルスに対する高度抵抗性遺伝子JAX1を同定した。本研究の成果はフレキシウイルスによる病害をウイルス、植物の抵抗性の両側面から研究することでウイルス病被害の軽減に貢献するものと考えられる。

引用文献

An G, Ebert PR, Mitra A, Ha SB (1988) Binary Vectors, Plant Molecular Biology Manual A3: 1–19

Adams SE, Jones RAC, Coutts RHA (1986) Expression of potato virus X resistance gene *Rx* in potato leaf protoplasts. *Journal of General Virology* 67: 2341–45

Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S, Ecker JR (1999) EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science* 284: 2148–52

Alvarado V, HB Scholthof (2009) Plant responses against invasive nucleic acids: RNA silencing and its suppression by plant viral pathogens. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20: 1032–40

Balzarini J, Neyts J, Schols D, Hosoya M, Van Damme E, Peumans W, De Clercq E. (1992) The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium hybrid* and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine)n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication in vitro. *Antiviral Research* 18: 191–207

Baratova LA, Fedorova NV, Dobrov EN, Lukashina EV, Kharlanov AN, Nasonov VV, Serebryakova MV, Kozlovsky SV, Zayakina OV, Rodionova NP (2004) N-terminal segment of potato virus X coat protein subunits is glycosylated and mediates formation of a bound water shell on the virion surface. *European Journal of Biochemistry* 271: 3136–45

Bari R, Jones JD (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* 69: 473–88

Baure`s I, Candresse T, Leveau A, Bendahmane A, Sturbois B (2008) The *Rx* gene confers resistance to a range of potexviruses in transgenic *Nicotiana* plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 1154–64

Bendahmane A, Kanyuka K, Baulcombe DC (1999) The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *The Plant Cell* 11(5): 781–92

Bendahmane A, Querci M, Kanyuka K, Baulcombe DC (2000) *Agrobacterium* transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: Application to the *Rx2* locus in potato. *Plant Journal* 21: 73–81

Bratlie MS, Drabløs F (2005) Bioinformatic mapping of AlkB homology domains in viruses. *BMC Genomics* 6: 1

Burrell CC, Tyler JK (eds) (2006) Propagating hellebores. Chapter 7. In: *Hellebores, a comprehensive guide*. Timber press, Portland, OR, USA, pp 186–206

Chisholm ST, Mahajan SK, Whitham SA, Yamamoto ML, Carrington JC (2000) Cloning of the *Arabidopsis RTM1* gene, which controls restriction of long-distance movement of tobacco etch virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(1): 489–94

Chisholm ST, Parra MA, Anderberg RJ, Carrington JC (2001) *Arabidopsis RTM1* and *RTM2* genes function in phloem to restrict long-distance movement of tobacco etch virus. *Plant Physiology* 127: 1667–75

Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ (2006) Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124: 803–14.

Chrispeels MJ, Raikhel NV (1991) Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell* 3: 1–9

Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16(6): 735–43

Cosson P, Sofer L, Le QH, Léger V, Schurdi-Levraud V, Whitham SA, Yamamoto ML, Gopalan S, Gall OL, Candresse T, Carrington JC, Revers F. (2010) *RTM3*, which controls long-distance movement of potyviruses, is a member of a new plant gene family encoding a meprin and TRAF homology domain-containing protein. *Plant Physiology* 154(1): 222–32.

Cosson P, Schurdi-Levraud V, Le QH, Sicard O, Caballero M, Roux F, Le Gall O, Candresse T, Revers F (2012) The RTM resistance to potyviruses in *Arabidopsis thaliana*: natural

variation of the *RTM* genes and evidence for the implication of additional genes. *PloS One* 7(6): e39169

Cowan MM (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564–82

Dangl JL, Horvath DM, Staskawicz BJ (2013) Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* 341(6147): 746–51

Decroocq V, Salvador B, Sicard O, Glasa M, Cosson P, Svanella-Dumas L, Revers F, García JA, 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 1302–11

Decroocq V, Sicard O, Alamillo JM, Lansac M, Eyquard JP, García JA, Candresse T, Le Gall O, Revers F (2006) Multiple resistance traits control *Plum pox virus* infection in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 541–49

de Ronde D, Butterbach P, Kormelink R (2014) Dominant resistance against plant viruses. *Frontiers in Plant Science* 5:307

Dodds PN, Rathjen JP (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* 11(8): 539–48

Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard CS (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant Journal* 45: 616–29

Eastwell KC, Druffel KL, du Toit LJ (2004) Etiology of ‘black death’ of *Helleborus* spp. Annual meeting of the American Society for Virology 23: P40-13 (Abstract)

Eastwell KC, du Toit LJ, Druffel KL (2009) *Helleborus net necrosis virus*: A new Carlavirus associated with ‘black death’ of *Helleborus* spp.. *Plant Disease* 93: 332–38

Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (2005) *Virus Taxonomy* 8th

edition, Academic Press, San Diego

Fernández-Fernández MR, Camafeita E, Bonay P, Méndez E, Albar JP, García JA (2002) The capsid protein of a plant single-stranded RNA virus is modified by O-linked N-acetylglucosamine. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 135–40

Fliegmann J, Mithofer A, Wanner G, Ebel J (2004) An ancient enzyme domain hidden in the putative β -glucan elicitor receptor of soybean may play an active part in the perception of pathogen-associated molecular patterns during broad host resistance. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 1132–40

Fraile A, García-Arenal F (2010) The coevolution of plants and viruses: Resistance and pathogenicity. *Advances in Virus Research* 76: 1–32

Fu DQ, Ghabrial S, Kachroo A (2009) GmRAR1 and GmSGT1 are required for basal, *R* gene-mediated and systemic acquired resistance in soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 86–95

Fujita T (2002) Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 2: 346–53

Glazebrook J, Rogers EE, Ausubel FM (1996) Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* 143: 973–82

Ghazala W, Waltermann A, Pilot R, Winter S, Varrelmann M (2008) Functional characterization and subcellular localization of the 16K cysteine-rich suppressor of gene silencing protein of tobacco rattle virus. *Journal of General Virology* 89: 1748–58

Hajimorad MR, Hill JH (2001) *Rsv1*-mediated resistance against soybean mosaic virus-N is hypersensitive response-independent at inoculation site, but has the potential to initiate a hypersensitive response-like mechanism. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 587–98

Harrison BD (2002) Virus variation in relation to resistance-breaking in plants. *Euphytica* 124:181– 92

Ishibashi K, Masuda K, Naito S, Meshi T, Ishikawa M (2007) An inhibitor of viral RNA replication is encoded by a plant resistance gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 13833–38

Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323–9

Kachroo P, Yoshioka K, Shah J, Dooner HK, Klessig DF (2000) Resistance to turnip crinkle virus in *Arabidopsis* is regulated by two host genes and is salicylic acid dependent but *NPR1*, ethylene, and jasmonate independent. *Plant Cell* 12: 677–90

Kachroo P, Chandra-Shekara AC, Klessig DF (2006) Plant signal transduction and defense against viral pathogens. *Advances in Virus Research* 66: 161–91

Kadaré G, Haenni A (1997) MINIREVIEW Virus-Encoded RNA Helicases. *Journal of Virology* 71(4): 2583–90

Kang BC, Yeam I, Jahn MM (2005) Genetics of plant virus resistance. *Annual Review of Phytopathology* 43: 581–621

Kawachi T, Sunaga Y, Ebato M, Hatanaka T, Harada H (2006) Repression of nitrate uptake by replacement of Asp105 by asparagine in AtNRT3.1 in *Arabidopsis thaliana* L. *Plant and Cell Physiology* 47: 1437–41

Kohm BA, Goulden MG, Gilbert JE, Kavanagh TA, Baulcombe DC (1993) A potato virus X resistance gene mediates an induced, nonspecific resistance in protoplasts. *Plant Cell* 5: 913–20

Koonin EV, Dolja VV (2014) Virus world as an evolutionary network of viruses and capsidless selfish elements. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 78(2): 278–303

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. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23: 283–93

King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (2012) *Virus Taxonomy* 9th edition, Academic Press, San Diego

Lam SK, Ng TB (2011) Lectins: Production and practical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89: 45–55

Liefting LW, Perez-Egusquiza Z, Clover GRG (2010) First report of *Helleborus net necrosis virus* in hellebore in New Zealand. *Plant Disease* 94: 479

Liu YL, Schiff M, Dinesh-Kumar SP (2004) Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, *COI1* and *CTR1* in *N*-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant Journal* 38: 800–9

Lukhovitskaya NI, Ignatovich IV, Savenkov EI, Schiemann J, Morozov SY, Solovyev AG (2009) Role of the zinc-finger and basic motifs of chrysanthemum virus B p12 protein in nucleic acid binding, protein localization and induction of a hypersensitive response upon expression from a viral vector. *Journal of General Virology* 90(3): 723–33

Mahajan SK, Chisholm ST, Whitham SA, Carrington JC (1998) Identification and characterization of a locus (*RTM1*) that restricts long-distance movement of tobacco etch virus in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 14(2): 177–86

Martelli GP, MJ Adams, JF Kreuze, VV Dolja (2007) Family *Flexiviridae*: a case study in virion and genome plasticity. *Annual Review of Phytopathology* 45: 73–100

Mathur J, Koncz C (1998) Establishment and maintenance of cell suspension cultures. *Methods in Molecular Biology* 82: 27–30

Minato N, Komatsu K, Okano Y, Maejima K, Ozeki J, Senshu H, Takahashi S, Yamaji Y, Namba S (2014) Efficient foreign gene expression in planta using a plantago asiatica mosaic virus-based vector achieved by the strong RNA-silencing suppressor activity of TGBp1. *Archives of Virology* 159(5): 885–96

Mithöfer A, Fliegmann J, Neuhaus-Url G, Schwarz H, Ebel J (2000) The hepta-b-glucoside

elicitor-binding proteins from legumes represent a putative receptor family. *Biological chemistry* 381: 705–13

Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, Shibuya N (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(49): 19613–8

Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T (2001) Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289:150–4

Mori Y, Notomi T (2009) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy* 15:62–9

Muthamilarasan M, Prasad M (2013) Plant innate immunity: An updated insight into defense mechanism. *Journal of Biosciences* 38(2): 433–49

Nagano AJ, Fukao Y, Fujiwara M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2008) Antagonistic jacalin-related lectins regulate the size of ER body-type β -glucosidase complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 49: 969–80

Nakahara KS, Masuta C, Yamada S, Shimura H, Kashihara Y, Wada TS, Meguro A, Goto K, Tadamura K, Sueda K, Sekiguchi T, Shao J, Itchoda N, Matsumura T, Igarashi M, Ito K, Carthew RW, Uyeda I (2012) Tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to and directing degradation of virus RNA silencing suppressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(25): 10113–8

Narusaka M, Kubo Y, Hatakeyama K, Imamura J, Ezura H, Nanasato Y, Tabei Y, Takano Y, Shirasu K, Narusaka Y (2013) Interfamily transfer of dual *NB-LRR* genes confers resistance to multiple pathogens. *PloS One* 8(2): e55954

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28

Pålsson-McDermott EM, O'Neill LA (2007) Building an immune system from nine domains. *Biochemical Society Transactions* 35: 1437–44

Peart JR, Lu R, Sadanandom A, Malcuit I, Moffett P, Brice DC, Schauser L, Jaggard DA, Xiao S, Coleman MJ, Dow M, Jones JD, Shirasu K, Baulcombe DC (2002) Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 10865–9

Peumans WJ, Van Damme EJM (1995) Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology* 109: 347–52

Raoult D, Forterre P (2008) Redefining viruses: lessons from Mimivirus. *Nature reviews Microbiology* 4: 315–9

Reddy DV, Sudarshana MR, Fuchs M, Rao NC, Thottappilly G. (2009) Genetically engineered virus-resistant plants in developing countries: current status and future prospects. *Advances in Virus Research* 75: 185–220

Rice G, Strangman E (eds) (1993) Pests and diseases. In: *The gardener's guide to growing hellebores*. David & Charles, London, UK, p 17

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. *Journal of General Virology* 90: 1014–24

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 of host antiviral silencing: two distinct suppressors for viral replication and viral movement encoded by potato virus M. *Journal of Virology* 85: 10269–78

Sharon N, Lis H. (1989) Lectins as cell recognition molecules. *Science* 246: 227–34

Shimizu T, Nakano T, Takamizawa D, Desaki Y, Ishii-Minami N, Nishizawa Y, Minami E, Okada K, Yamane H, Kaku H, Shibuya N (2010) Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *The Plant Journal* 64(2): 204–14

Solomon-Blackburn RM, Barker H (2001) A review of host major-gene resistance to potato viruses X, Y, A and V in potato: genes, genetics and mapped locations. *Heredity* 86: 8–16

Soosaar JLM, Burch-Smith TM, Dinesh-Kumar SP (2005) Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nature Reviews Microbiology* 3: 789–98

Spoel SH, Dong X (2012) How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology* 12(2): 89–100

Staswick PE, Su W, Howell SH (1992) Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 6837–40

Takahashi H, Kanayama Y, Zheng MS, Kusano T, Hase S, Ikegami M, Shah J (2004) Antagonistic interactions between the SA and JA signaling pathways in *Arabidopsis* modulate expression of defense genes and gene-for-gene resistance to cucumber mosaic virus. *Plant Cell Physiology* 45: 803–9

Takeda M, Sugimori N, Torizawa T, Terauchi T, Ono AM, Yagi H, Yamaguchi Y, Kato K, Ikeya T, Jee J, Güntert P, Aceti DJ, Markley JL, Kainosho M (2008) Structure of the putative 32 kDa myrosinase-binding protein from *Arabidopsis* (At3g16450.1) determined by SAIL-NMR. *FEBS Journal* 275: 5873–84

Tobias, I., Rast, A.Th.B., and Maat, D.Z. (1982). Tobamoviruses of pepper, eggplant and tobacco: Comparative host reactions and serological relationships. *European Journal of Plant Pathology* 88: 257–68

Van Damme EJM, Peumans WJ, Barre A, Rouge P (1998) Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17: 575–692

Van Damme EJM, Barre A, Rougé P, Peumans WJ (2004) Cytoplasmic/nuclear plant lectins: A new story. *Trends in Plant Science* 9: 484–9

Verlaan MG, Hutton SF, Ibrahim RM, Kormelink R, Visser RG, Scott JW, Edwards JD, Bai Y (2013) The *Tomato yellow leaf curl virus* resistance genes *Ty-1* and *Ty-3* are allelic and code for DFDGD-class RNA-dependent RNA polymerases. *PLoS Genetics* 9(3): e1003399

Whitham SA, Anderberg RJ, Chisholm ST, Carrington JC. (2000) *Arabidopsis RTM2* gene is necessary for specific restriction of tobacco etch virus and encodes an unusual small heat shock-like protein. *The Plant Cell*, 12(4): 569–82

Willment JA, Brown GD (2008) C-type lectin receptors in antifungal immunity. *Trends in Microbiology* 16: 27–32

Zhou ZS, Dell'Orco M, Saldarelli P, Turturo C, Minafra A, Martelli GP (2006) Identification of an RNA-silencing suppressor in the genome of *Grapevine virus A*. *Journal of General Virology* 87: 2387–95

Zvereva AS, Pooggin MM (2012) Silencing and innate immunity in plant defense against viral and non-viral pathogens. *Viruses* 4(11): 2578–97

池上正人, 上田一郎, 奥野哲郎, 夏秋啓子, 難波成任 (2009) 植物ウイルス学 朝倉書店

石橋和大, 錦織雅樹, 馬渡なつき (2007) ウイルスに対する静的な抵抗性 蛋白質核酸酵素 52(6): 686-91

榮森弘己 竹内純 (2003) ヘレボルスに発生した数種病害 平成 15 年度東京都農林総合研究センター研究成果情報 169-170

難波成任 (2008) 植物医科学 (上) 養賢堂

謝辞

多くの方々のご指導、ご協力があって本研究を遂行することができた。ここでお世話になった方々に謝意を表したい。

まず、東京大学農学生命科学研究科植物病理学研究室 難波成任教授には最高の研究環境を整えて頂き、実験結果についての議論やゼミなどを通して研究の指針、研究者のあり方、心構えを説いて下さった。また、本論文の作成に関しても懇切、丁寧にご指導頂いた。深く、心より感謝したい。

同研究科植物医科学研究室の橋本光司特任教授には植物病の診断をするにあたり、複雑に様々な要素の絡まり合った病害発生状況を解きほぐし原因を推定していく術をご指導頂いた。

同研究科植物病理学研究室の山次康幸准教授、前島健作特任助教、同研究科植物医科学研究室 橋本将典助教には研究を進める上で実験手法をご指導頂くと共に、実験結果について議論させて頂くことで研究の方向性を示して頂いた。ここに全ての名前を挙げることはできないが、両研究室の研究員、学生、職員の皆様には日々、研究の難しさと楽しさを共有することで研究生生活を支えて頂いた。また、東京都小笠原亜熱帯農業センター 星秀男氏、東京都農林水産振興財団 栄森弘己氏には共同で研究を進めさせて頂き、ひとかたならぬお世話になった。

最後に、長い学生生活を静かに暖かく見守り、支え続けてくれた家族に感謝したい。