

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻
平成 24 年度博士課程進学

白石 拓也
指導教員 東京大学大学院教授 難波 成任

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

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発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、シロイソ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。