

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 白石 拓也

植物ウイルスは世界各地で農作物生産に甚大な被害を引き起こしている。植物ウイルスには有効な化学農薬が存在しないことから、植物ウイルスの発生を防ぐべく適切な予防措置を講じ、また植物ウイルスが発生した場合には早期に診断し対処することが重要である。本研究ではひも状植物ウイルスのフレキシウイルスを対象として、植物ウイルス診断技術の確立を試みた。また、植物ウイルス病の予防に最も効果的な手段の一つがウイルス抵抗性品種の導入であるが、植物ウイルスに対する抵抗性遺伝子やその分子メカニズムは依然として十分に解明されていない。そこで、本研究ではフレキシウイルスを対象として、ウイルス抵抗性遺伝子を探索・同定し、その機能解析を行った。

1. 黒死病罹病クリスマスローズから分離したカルラウイルスに関する研究

東京都で10年ほど前からクリスマスローズに原因不明の黒変症状が発生し問題となっていた。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。この症状はアメリカで発生が確認されているベータフレキシウイルス科カルラウイルス属ウイルス *Helleborus net necrosis virus* (HeNNV) による black death 病の症状と酷似していた。そこで、このクリスマスローズの黒変症状の病因解明を試みた。感染植物粗汁液の電子顕微鏡観察により、ひも状の 600 ~ 900 nm のウイルス様粒子が観察され、また HeNNV のゲノムを特異的に増幅可能なプライマーを用いた RT-PCR により、特異的な DNA 断片が増幅された。以上より、罹病植物に HeNNV が感染していることを証明した。HeNNV の発生確認は我が国で初めてであり、本病の和名として「クリスマスローズ黒死病」を提案した。さらに本分離株のゲノム全長塩基配列を解析し、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 塩基であり、HeNNV アメリカ分離株と高い相同性を示した。

さらに HeNNV の迅速診断系を確立する目的で、従来の PCR 法に比べ格段に簡易・迅速な等温遺伝子増幅法である Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を用いた診断手法の開発を試みた。決定した全長塩基配列をもとに reverse transcription-LAMP (RT-LAMP) 反応に最適なプライマーを設計し、反応温度条件等を検討することにより HeNNV の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 JAXI に関する研究

植物ウイルスに対する知見を得ることを目的として、新たなウイルス抵抗性遺伝子の探索を試

みた。その標的ウイルスとしてはアルファフレキシウイルス科ポテックスウイルス属の *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) を用いた。まず、GFP を発現する PIAMV 感染性クローン (PIAMV-GFP) を利用し、シロイヌナズナの多数のエコタイプの中から、抵抗性エコタイプのスクリーニングを行い、5つの抵抗性エコタイプを単離した。

ウイルス抵抗性の遺伝学的基盤を明らかにするために、5エコタイプのうちの Bay-0 と感受性エコタイプの Col-0 を交配し、その子孫世代に対して遺伝解析を行うことで、本抵抗性が単一優性遺伝子座によるものであることを示した。次いでファインマッピング解析により、抵抗性遺伝子座を1番染色体上の約130 kbの領域に絞り込んだ。この領域中にある遺伝子の中から TAIR データベースを参考に抵抗性遺伝子候補としてジャカリンレクチンをコードする遺伝子に着目し、相補実験を行った結果、本遺伝子が Bay-0 の抵抗性遺伝子であることが示され、本遺伝子を *JAX1* (*jacalin-type lectin required for potexvirus resistance 1*) と名付けた。

JAX1 抵抗性の作用機構を調べるために機能解析を行った。まず、*JAX1* の発現パターンを解析したところ、*JAX1* は、主に維管束組織で発現していることを示した。次に *JAX1* 抵抗性がウイルス感染のどの過程を阻害しているか調べるため、シロイヌナズナプロトプラストを用いた解析を行った。プロトプラストに PIAMV-GFP と *JAX1* をトランスフェクションしたところ、ウイルス蓄積量が強く抑えられた。よって *JAX1* 抵抗性は細胞レベルでウイルスの増殖を抑える高度抵抗性であることが示された。さらに、*JAX1* 抵抗性が有効なウイルス範囲を調べた。*JAX1* 形質転換 *Nicotiana benthamiana* に種々のウイルスを接種したところ、調べた全てのポテックスウイルスは感染を阻害されたが、他属のウイルスは全身に感染した。よって *JAX1* 抵抗性は広くポテックスウイルスに有効であることが示唆された。最後に既知のウイルス抵抗性で観察される反応を *JAX1* 抵抗性についても観察したが、活性酸素種の蓄積や過敏感細胞死は観察されず、*JAX1* 抵抗性と既知の抵抗性では作用機構が異なることが示唆された。

以上により、*JAX1* 抵抗性は広範囲のポテックスウイルスに対して細胞レベルでウイルス蓄積を阻害する高度抵抗性であることを示した。既報の植物ウイルス抵抗性遺伝子 *RTMI* と併せて、*JAX1* による抵抗性は既存の一般的な病害抵抗性である真正抵抗性とは異なる抵抗性であることを示し、これらを総括してレクチン抵抗性と名付けた。

以上を要するに、本研究ではクリスマスローズの黒死症状の病原が HeNNV であることを突き止め、本病に対する簡便で迅速な高感度遺伝子検出系を確立した。さらに、農業上重要なウイルスを多数含むポテックスウイルス属ウイルスの感染を強く抑制する高度抵抗性を司る遺伝子 *JAX1* を同定し、その機能解析を行った。本研究の成果は学術的にも農業生産においても極めて重要な研究成果である。以上により、審査委員一同は本論文が博士（農学）に値するものと認めた。