

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18580047
 研究課題名(和文)カリフラワーモザイクウイルス多機能性封入体蛋白質が持つ感染拡大機能の分子機構
 研究課題名(英文) Molecular mechanism for the pathogenic function of *Cauliflower mosaic virus* multifunctional inclusion body-matrix protein
 研究代表者
 小林 括平 (KOBAYASHI KAPPEI)
 財団法人岩手生物工学研究センター・生命科学研究部・主任研究員
 研究者番号：40244587

研究成果の概要：病原性因子を欠損したカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) は、シロイヌナズナに全身感染できない。しかし、本研究で得られたシロイヌナズナ突然変異体、F12 は、上記欠損ウイルスに全身感染を許す。さらに、F12 変異体は、野生型 CaMV やその他のウイルスに感染した場合、野生型植物よりも激しい病徴を示した。これらの結果から、F12 変異体では多くの植物ウイルスに対して共通して働く植物の病害抵抗性メカニズムが、機能不全に陥っているものと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,100,000	0	1,100,000
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	720,000	4,220,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：植物・病原体相互作用、ウイルス、病原性因子、病害抵抗性、全身感染

1. 研究開始当初の背景

作物の減収要因となるウイルス病は、植物側のウイルス感染を抑制しようとする抵抗性因子と、これを打ち破ろうとするウイルス側の病原性因子との相互作用によって成り立っている。植物の基礎的なウイルス抵抗性メカニズムの一つとして、RNA サイレncing が重要な役割を果たすことが明らかにされてきた。また、これを打ち破るサイレンシング・サプレッサーを多くのウイルスが保有していることも明らかになった。さらに、細胞死を伴う抵抗反応を引き起こすウイルス抵抗性遺伝子の一部で、サイレンシング・サブ

レッサーを認識し、抵抗反応を活性化する例も見いだされた。しかし、ウイルス抵抗性遺伝子が認識するウイルス因子のすべてがサイレンシング・サプレッサー機能を有する訳ではなく、RNA サイレncing 以外にもウイルスに対する基礎的抵抗性機構が存在するものと推察される。

我々は、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の翻訳活性化因子/ピロプラズミン (Tav) の機能に着目し、その単一細胞内でのウイルス複製における役割および宿主植物での感染拡大における役割を明らかにしてきた。Tav は CaMV の ORF VI にコードされ、

感染細胞中の細胞質に形成されるウイルス封入体（ピロプラズム）のマトリックスの主成分であり、ポリシストロニックな mRNA の翻訳を可能にする翻訳活性化因子でもあり、また、外皮蛋白質および逆転写酵素（CaMV DNA 複製酵素）の安定な蓄積に寄与する。これら単一細胞内での CaMV 複製に必要な機能に加えて、非親和性宿主における非病原性蛋白質として機能することも知られていたが、我々はさらに、Tav が感受性宿主における感染拡大に必要な領域を含むこと、およびこの領域が非親和性宿主における非病原性を規定する領域と重なることを明らかにした。Tav（520 アミノ酸残基）の N 末端近傍領域（領域 2 <41-73 番アミノ酸> および / または 3 <81-109 番アミノ酸> ; 病原性 / 非病原性 <Vi / Av> 領域）を欠失した変異体 Tav（TavD2 および TavD3）は、野生型と同レベルのウイルス複製を支持でき、感染初期の接種葉におけるウイルス増殖も野生型と大差ないが、その後の感染拡大は著しく遅延し、病徴も非常に軽微であった。しかし、TavD2 または TavD3 を持つ CaMV（TavD2-または TavD3-CaMV）の感染拡大は、遅いながらも進行し続け、感染葉におけるウイルス蓄積量も野生型とほぼ同等のレベルに達した。また、Brassica napus など報告されているようなサイレンシングによる感染からの回復は認められなかった。以上の結果から、Tav の領域 2 および 3 は、植物が CaMV の感染拡大を阻害する基礎的な抵抗性メカニズムのうち、サイレンシング以外のものを抑制する働きを持つと考えられた。

2. 研究の目的

上述の基礎的なウイルス抵抗性メカニズムを明らかにすることを最終目標とし、本研究では、Tav-欠損弱毒 CaMV の全身感染を許容する宿主シロイヌナズナ変異体を取得し、その解析を通して植物の基礎的なウイルス抵抗性メカニズムに関する知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナ変異体のスクリーニング
シロイヌナズナ（エコタイプ、Col-0）は定法によってエチルメタンサルホン酸で種子を処理し、突然変異を誘発した。CaMV は他のウイルスと比べて増殖量が低く、精製ウイルスを大量に調製することが困難であるため、野生型および Tav 欠損弱毒 CaMV のアグロインフェクション法を確立し、シロイヌナズナ変異体のスクリーニングに用いた。接種は、一晚培養したアグロバクテリウムをアセトシリソニン処理したものを接種原とし、カーボランダムをふりかけた葉に 1 μl 容のイノキュレーションループを用いて擦り付ける

ことによって行った。育成した M2 個体それぞれに Tav 欠損弱毒 CaMV 発現系を保有するアグロバクテリウムを接種し、4 週間後に上位ロゼット葉について、ティッシュプリント免疫染色法によってウイルス感染の拡大を検討した（一次スクリーニング）。一次スクリーニングで CaMV 陽性であった個体は、さらに維持することによって自殖種子を採取した。多くの変異体が劣性遺伝することが想定されたので、自殖後代を用いて二次スクリーニングを行った。二次スクリーニングでは、各系統、8 ~ 10 個体に一次スクリーニングと同様にウイルスを接種し、4 週間後にウイルスの全身感染の有無をハンマープロット免疫染色法によって検討した。

(2) シロイヌナズナ変異体の各種ウイルス感染に対する反応

得られた変異体の各種ウイルス感染に対する反応を検討する目的で、以下のウイルスを接種した。野生型 CaMV はアグロインフェクション法によって接種し、4 週間後に病徴観察およびハンマープロット免疫染色法によってウイルス感染の広がりを確認した。トマトモザイクウイルス（ToMV）、パブリカ微斑ウイルス（PaMMV）およびインゲン黄斑モザイクウイルス（BYMV）では、それぞれのウイルスに感染したニコチアナ ベンサムアーナ葉の摩砕汁液を接種原として用いた。接種 4 週間後に病徴観察を行い、全 RNA を抽出した。ウイルス感染の広がりをそれぞれのウイルスに特異的な RT-PCR によって確認した。

(3) シロイヌナズナ変異の遺伝解析

得られた変異の遺伝様式を明らかにする目的で、変異体の花粉を用いてシロイヌナズナ、エコタイプ、Landsberg *erecta* (Ler) に受粉させ、F1 種子を得た。4 個体の F1 を用いて Tav 欠損弱毒 CaMV 感染に対する反応を確認したのち、F2 世代についても Tav 欠損弱毒 CaMV 感染に対する反応を検討した。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナ変異体のスクリーニング
スクリーニング開始当初は、感受性宿主における全身感染能が著しく損なわれた変異体、TavD2 を持つ CaMV を用いた。しかし、野生型シロイヌナズナを用いた検討から、この弱毒ウイルス変異系統が低率ながら茎生葉（cauline leaf）への移行を示すことがわかった。そこで、TavD2-CaMV を用いた一次スクリーニング（約 3100 個体）における陽性系統の二次スクリーニングには、ほぼ完全に全身感染能を失っている TavD23 を持つより弱毒の変異系統を用いた。また、以後の一次スクリーニング（約 1000 個体）にも TavD23-CaMV を用いた。
一次スクリーニングの結果、ティッシュプリ

ント免疫染色法で陽性を示した M2 個体は、147 あった。しかし、その多くが不稔性であり、62 個体においてのみ自殖種子が得られた。うち 6 個体では種子の収量が低く、二次スクリーニングには 56 系統を供試した。一次スクリーニング陽性個体で不稔のものが多かった原因は不明であるが、基礎的ウイルス抵抗性に関する因子が植物の稔性にも関与する可能性が考えられる。

二次スクリーニングに供した 56 系統中、6 系統では、TavD23-CaMV の全身感染が全く認められなかった。また、15 系統では全身感染個体率は 50% 以下であった。これらの結果は、一次スクリーニングにおいて TavD2-CaMV を用いたため、Tav-欠損 CaMV の全身感染を全く、もしくはほとんど許容できない植物も選抜されたことを示しており、本研究において一次スクリーニングに用いるウイルスの重要性を再確認させるものである。一方、11 系統では、接種葉における局所感染の成立がハンマープロット免疫染色法で証明された個体全てにおいて、上位葉へのウイルス移行が確認された。このことから、TavD2-CaMV を用いたスクリーニングにおいても目的の変異体を得ることができたと考えられる。しかし、それらの大部分の系統では、上位葉の半分以下においてのみ CaMV が検出可能であった。また、一枚の上位葉においてもそのごく一部でしか CaMV の増殖が認められないものもあった (図 1、E27)。以上の結果から、植物ウイルスが局所で感染を成立させた後、全身感染へと至るには、複数の確率的な過程を経る必要があり、本研究で得られた変異体の多くでは、そのうちの一部が機能不全となっているものと考えられる。

唯一、F12 系統では、接種葉の局所感染が証明された全ての個体で、茎頂部に近い幼弱な口ゼット葉の大部分においても CaMV が検出され (図 1) また全ての個体で典型的な CaMV 感染の病徴である葉脈透過が観察された。すなわち、F12 系統においては、Tav 欠損弱毒

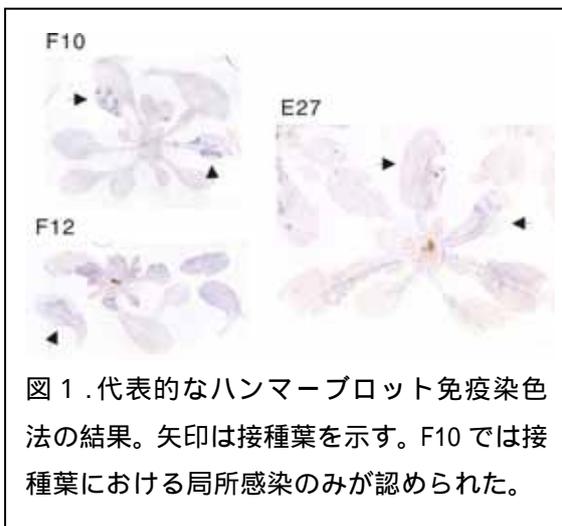


図 1 . 代表的なハンマープロット免疫染色法の結果。矢印は接種葉を示す。F10 では接種葉における局所感染のみが認められた。

CaMV の全身感染を許容するという表現型が他の系統よりも安定して発現することが明らかになった。また、F12 系統では、非感染時における形態異常等の表現型は認められなかった。

効率よく TavD23-CaMV の全身感染を許容した 11 系統中、6 系統について Ler との F1 取得を試みたが、交配効率が低く、種子を得るには至らなかった。F12 の表現型が安定していたことから、これに集中して交配を繰り返し、Ler との F1 を得た。

(2) F12 系統の特性

Tav-欠損および野生型 CaMV 感染に対する反応

F12 系統は、もっとも弱毒性の Tav 欠損変異 CaMV である TavD23-CaMV の全身感染を許容する変異系統であり、より弱毒程度の低い TavD2-CaMV や TavD3-CaMV、さらに強毒の野生型 CaMV によっても全身感染を受けると考えられる。そこで、F12 系統に野生型、TavD2-または TavD3-CaMV を接種した。その結果、野生型シロイヌナズナに低率でしか全身感染しない TavD2-および TavD3-CaMV も、F12 系統には効率よく全身感染した。また、野生型シロイヌナズナは野生型 CaMV 感染に際して接種約 2 週間後に病徴を発現し始めるのに対し、F12 系統では、接種 10 日後にすでに明瞭な病徴が観察され、4 週間後の病徴は野生型シロイヌナズナと比べて格段に重篤であった。このことは、F12 変異の原因遺伝子は、CaMV 感染の拡大を完全に阻止するのではなく、感染拡大を遅延させる機能を持つことを示唆する。

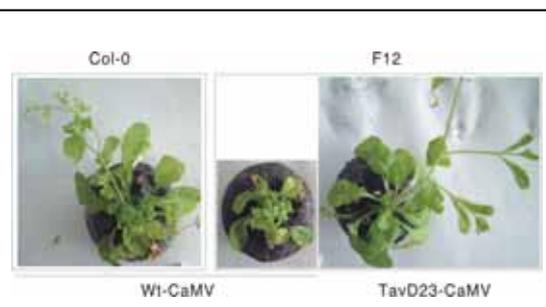


図 2 . 野生型 (Wt-) および Tav- 欠損 (TavD23-) CaMV に全身感染した、野生型 (Col-0) および変異体 (F12) シロイヌナズナの病徴

CaMV 以外のウイルスに対する F12 系統の反応

上述の結果から、F12 系統ではウイルスの感染拡大を遅延させる機能が欠損しているこ

とが示唆された。そこで、F12 系統における他のウイルスの病原性について検討した。ToMV および PaMMV はシロイヌナズナ Col-0 に全身感染可能であるが、明瞭な病徴は引き起こさない。ところが F12 系統においては、著しい生育抑制とウイルス病徴様の葉の黄化が認められた。しかし、接種後 4 週間の検討では、ウイルスの蓄積量には Col-0 と F12 系統の間で差異は認められなかった。一方、BYMV は Col-0 にごく低率にしか全身感染しないが、F12 系統では若干の生育抑制が認められた。しかしながら F12 系統では BYMV の蓄積は検出されず、観察された生育抑制がウイルス感染拡大の加速によるものか否か、現段階では不明である。以上の結果は、F12 変異の原因遺伝子は、感染拡大を遅延させる機能を持つという考えに矛盾しない。

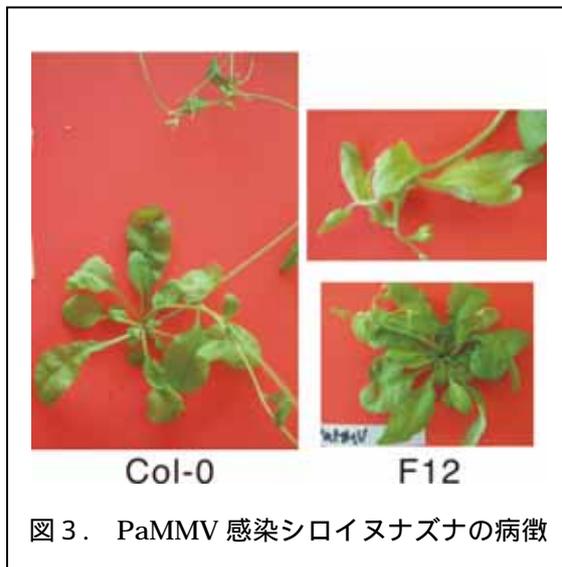


図 3. PaMMV 感染シロイヌナズナの病徴

(3) F12 系統の遺伝解析

F12 系統と Ler の F1 種子は、十数粒しか得られなかったが、8 粒が発芽した。うち 4 個体について、TavD23-CaMV の全身感染を許容するか否か検討したところ、この形質が劣性遺伝することが確認された。残りの個体から得られた F2、500 個体について TavD23-CaMV の全身感染を許容するか否か検討したところ、126 個体で程度の異なる病徴が観察された。この結果は、F2 における分離比 3 : 1 で全身感染非許容（野生型の表現型）と許容（変異体の表現型）が分離したことを示しており、F12 系統の変異が一遺伝子劣性の変異であることを示唆する。

(4) 今後の展望

F12 変異の原因遺伝子は、ウイルスの感染拡大を遅延させる機能を持つことが示唆された。これまで、RNA サイレンシングに

関与するものではないと推察される。最近、CaMV の Tav がサイレンシング・サプレッサー機能を持つことが報告されたが、その機能ドメインは特定されていない。また、Tav が NPR1 と相互作用し、サリチル酸経路を抑制することも示唆されている。今後、既知の変異体における野生型および Tav 欠損 CaMV の病原性を F12 系統と比較検討するとともに、F12 変異の原因遺伝子を同定することによって、Tav が標的とする植物のウイルス感染拡大遅延因子を特定し、その作用機構を明らかにできるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林括平 (KOBAYASHI KAPPEI)

財団法人 岩手生物工学研究センター・生命科学部・主任研究員

研究者番号：40244587

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし