

機関番号：10101
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20580002
 研究課題名(和文) 植物ウイルス病における病徴制御法の開発～アブラナ科植物とカブモザイクウイルス～
 研究課題名(英文) Development of symptom control system for plant virus disease -Brassica crops and Turnip mosaic virus-
 研究代表者
 犬飼 剛 (INUKAI TSUYOSHI)
 北海道大学・大学院農学研究院・助教
 研究者番号：90223239

研究成果の概要(和文)：カブモザイクウイルスに感染したハクサイ・カブにおける病徴は、宿主・ウイルス双方の遺伝子の組み合わせによって決定される。本研究では、ウイルスに対する抵抗性反応並びに感染後の病徴である全身えそ、葉の奇形及びモザイクが宿主の *Rnt1* 遺伝子座とウイルスの CI 遺伝子における遺伝子型の組み合わせによってそれぞれ決定されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the pathosystem of *Brassica rapa* and *Turnip mosaic virus* (TuMV), the type of symptoms expressed by susceptible plants are determined by the gene combinations between the host cultivar and virus strain. In this study, we found that the resistant reaction and symptoms such as systemic lethal necrosis, leaf malformation and mosaic were differentially determined, depending on the combinations of the genotypes for the *Rnt1* locus and the viral CI gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：抵抗性・耐性

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物ウイルス病の発生を耕種の防除あるいは薬剤防除により抑えるのは難しい。最もよく行なわれる防除方法はウイルスに対する抵抗性品種の利用であるが、ウイルスに対する抵抗性遺伝子を用いるにはいくつかの問題がある。一つは、単一の遺伝子による抵抗性はウイルスの変異によって崩壊しやすいため、長期間に渡って安定した抵抗性を維持できない点である。また、宿主植物とウイルスの組み合わせによっては抵抗性の遺

伝資源に限られる場合もある。このため、ウイルス感染後の病徴をいかに抑えるかという観点から耐性育種を考える必要がある。

(2) カブモザイクウイルス (*Turnip mosaic virus*, TuMV) の宿主範囲は広く、アブラナ科の他キク科、アカザ科、ナデシコ科及びナス科など 20 科の植物に感染する。病徴はえそ、モザイク、奇形、萎縮など様々であり、ハクサイ・カブにおいてはえそモザイク病及びモザイク病と呼ばれる。えそモザイクが早

期に発病すると枯死するケースが多く、後期に発病した場合でも壊死した組織で軟腐病に感染しやすくなる他、品質に対する影響が大きい。モザイク病も早期に発病すると結球しなくなるため被害が大きいが、中後期に発病した場合はえそモザイクに比べると収量・品質に対する影響が小さい。こうした感染後の病徴については品種間差が存在するため、育種によって病徴の軽い品種の育成は可能と考えられるが、多様な病徴がどのようなメカニズムによって誘導されるのかについて十分な知見がまだ得られていない。

2. 研究の目的

本研究では TuMV に感染したハクサイの病徴誘導機構を明らかにすることを目的に、抵抗性、えそ及び葉の奇形誘導に関するハクサイの遺伝子の遺伝学的同定とその遺伝子座の fine mapping を行った。また、変異ウイルスを用いた実験によりウイルス側の病徴決定因子の同定を行い、宿主とウイルス双方の遺伝子の組み合わせによって病徴がどのように制御されるのか解析した。

3. 研究の方法

(1) 供試ウイルス及び接種試験

TuMV のダイコン系統 (TuR1)、キャベツ系統 (TuC)、アブラナ系統 (UK1) 及びハクサイ系統 (C2 及び C3) を供試した。接種はハクサイ・カブの子葉あるいは本葉に汁液接種により行なった。抵抗性及び病徴の判定は、接種後 10 日目における接種葉及び非接種上位葉を観察して行った。病徴が不明瞭なものについては ELISA 及び tissue printing を行いウイルス感染の有無を確認した。

(2) 供試植物及び栽培方法

ハクサイ品種「秋まさり」「優春」「はやひかり」「山東白菜」「空海 70」「空海 65」「黄ごころ 65」、カブ品種「早生大蕪」「雪姫かぶ」「ふゆとよ小蕪」「京の雪」「耐病ひかり」及びそれらの自殖・交雑後代を用いた。ジフィーポットに種子を 1 粒ずつ播種し、グロースチャンパー (温度 21°C、12 時間日長) または温室 (温度 24~30°C、自然日長) で育成した。

(3) DNA 多型マーカーを用いた抵抗性遺伝子の fine mapping

「秋まさり」型抵抗性遺伝子の fine mapping 用として「秋まさり」由来の抵抗性系統 AS9 及び罹病性系統 SS11 (「山東白菜」由来) の交雑 F₂ 集団を用いた。植物組織からの DNA 抽出は CTAB 法によった。SSR (simple sequence repeat) マーカーについては、データベース「VegMarks」 (<http://vegmarks.nivot.affrc.go.jp>) で公開されている SSR マーカー用のプライマー情報をもとにプライマーを合成し、PCR 後電

気泳動を行って多型を検出した。CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) 及び PCR indel (insertion/deletion) マーカーについてはデータベース「BRAD」 (<http://brassicadb.org/brad/>) の scaffold 配列 9 及び 129 の配列に基づいて作成した。

(4) UK1 突然変異体のシークエンス及び UK1 感染性クローンの site-directed mutagenesis

UK1 に全身感染しえそを起こした抵抗性系統 AS9 の葉から TRIZOL 試薬 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて RNA を抽出した。UK1 変異体における変異部位を特定するため、AMV Reverse Transcriptase XL (Takara, Tsu, Japan) を用いてウイルス由来の cDNA を合成後、KOD-Plus- ver. 2 DNA polymerase (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて PCR 増幅し、増幅断片を pCR-XL-TOPO vector (Invitrogen) or pGEM-T vector (Promega, Madison, WI, USA) にクローニングした。DNA の配列は ABI PRIZM 310 Genetic Analyzer を用いて常法により決定した。UK1 感染性クローンへの点突然変異の導入は、QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Santa Clara, CA, USA) のプロトコールに準じて行った。

4. 研究成果

(1) TuMV-UK1 感染に対する *Brassica rapa* の病徴決定因子の遺伝解析

ハクサイ品種「優春」、「はやひかり」及びカブ品種「早生大蕪」に UK1 を接種すると「優春」ではえそモザイク、「はやひかり」では奇形を伴うマイルドなえそモザイク、「早生大蕪」ではモザイクを示し、いずれも感受性であった。「はやひかり」では葉脈に生じたえそにより葉が奇形化する様子が観察された。一方、ハクサイ品種「秋まさり」及び「秋まさり」に由来する S₂ 系統 AS9 は HR 型の抵抗性を示した。しかし、後述する UK1 に非同義置換が生じた変異体 UK1m 変異体を接種すると、AS9 では抵抗性が打破されて全身えそを示した。さらに「優春」ではマイルドなモザイク、「はやひかり」及び「早生大蕪」ではマイルドなモザイクが観察されるなど、病徴は UK1 の場合と明らかに異なっていた。このように、抵抗性だけでなく、ウイルスに感染した際の病徴のタイプも品種とウイルス系統との組合せによって特異的に決まっていることから、病徴も宿主の因子とウイルスの因子間における相互作用によって決定されていると考えられた。

宿主側のえそ誘導因子を明らかにするため、「優春」、「はやひかり」及び「秋まさり」の自殖第 1 世代 (S₁) を養成し、UK1 を接種した。優春 S₁ 世代では供試した 83 個体全てが「優春」と同様の NM 型の病徴を示し、「優

春」がもつえそ誘導遺伝子はホモ型で固定されていることが示された。「はやひかり」 S_1 世代では供試した45個体中11個体がえそ病徴を、34個体がモザイク病徴を示し、ほぼ1:3に分離した。このえそは「優春」で観察されたのと同程度の厳しいえそ病徴であった。このことから、「はやひかり」は単一劣性のえそ誘導遺伝子をヘテロ型で有しており、ヘテロである場合えその程度は弱まると考えられた。また、 S_1 集団で「はやひかり」型の分離がほとんど観察されなかったのは、えその程度が環境要因や遺伝的背景によって影響を受けやすいためと考えられた。一方、モザイクを示した34個体中20個体がえそを伴わずに奇形を示したことから、「はやひかり」は葉の奇形を誘導する因子を他に持っていると考えられた。「秋まさり」 S_1 世代では供試した38個体中29個体が抵抗性、9個体がモザイク病徴を示し、3:1の理論比に適合した。これより、「秋まさり」は1個の優性抵抗性遺伝子をヘテロ型で有していることが明らかとなった。

「優春」のえそ誘導遺伝子と「秋まさり」の抵抗性遺伝子の対立性を調べるため、「秋まさり」と「優春」の交雑第1世代(F_1)を養成し、UK1を接種した。供試した全96個体中46個体が抵抗性、50個体が感受性であり、抵抗性と感受性の個体がほぼ1:1に分離した。さらに、 F_1 個体から交雑第2世代(F_2)を養成し、これらにUK1を接種したところ、12集団中6集団で抵抗性と激しいえそが3:1の比に分離し、残り6集団でえそとモザイクが1:3の比に分離した。この結果と F_1 での結果から、「優春」のえそ誘導遺伝子が不完全劣性遺伝子であること、「秋まさり」の抵抗性遺伝子と「優春」のえそ誘導遺伝子は同座か密接に連鎖していることが示された。優性遺伝子と劣性遺伝子との間の同座性は交雑実験の結果のみから証明することはできないが、ここでは同座であると仮定して、この遺伝子座を *Rnt1* (Resistance and necrosis to TuMV 1) とし、抵抗性を誘導する「秋まさり」の対立遺伝子を *Rnt1-1*、えそを誘導する「優春」の対立遺伝子を *rnt1-2*、「秋まさり」のモザイクを誘導する対立遺伝子を *rnt1-3* とした。*rnt1-2*は*rnt1-3*に対して不完全劣性であり、*rnt1-2/rnt1-3*の遺伝子型ではUK1感染時に葉脈に沿ったマイルドなえそによる奇形を示す。

次にこの *Rnt1* 遺伝子座の染色体上での位置を明らかにするため、DNA多型マーカーを用いた連鎖解析をおこなった。材料として *Rnt1-1* をホモ型で有する系統 AS9 (「秋まさり」の S_2 系統) とモザイク病徴を示す系統 SS11 (ハクサイ品種「山東白菜」の S_1 系統) の F_2 世代46個体を用いた。この接種試験において、 F_2 集団では142個体中108個体が抵

抗性を示し、29個体が激しいえそ、5個体が軽微なえそ病徴を示した。AS9及びSS11ともえそ誘導因子は有していないと考えられたため、この病徴の分離は不可解であった。しかし、SS11はUK1に対してモザイク病徴を示すが、僅かなえそ斑点を示す場合がある。当初、このえそ斑点はウイルス感染によるものではないと判断されたが、 F_2 で激しいえそを示す個体が分離してきたことを考えると、SS11はえそ誘導因子を有しているが、遺伝的バックグラウンドによりごく軽微なえそ病徴が現れているものと考えられた。*Rnt1-1* はすでに報告のある *TuRB01b* と同じく TuMV 系統 UK1 に対する抵抗性遺伝子であり、また、次節で詳しく述べるようにウイルス側の非病原性遺伝子も同じ CI 遺伝子である。これらの点から、*Rnt1-1* と *TuRB01b* は同一の遺伝子であるか、同座の対立遺伝子である可能性があると考えられたため、*TuRB01b* が座乗するハクサイ染色体 R6 上の SSR マーカーを用いて連鎖解析を行った。その結果、*Rnt1-1* は染色体 R6 上に座乗しており、SSR マーカー BRMS-221 と BRMS-013 の間に位置していることが明らかとなった。さらに *Rnt1-1* の fine mapping を行うため、ハクサイゲノムの scaffold 配列からこれらのマーカー配列を含む No. 9, No. 47 及び No. 129 の配列を用いて CAPS 及び PCR indel マーカーを6個作成し連鎖解析を行った。その結果、129-2k 及び 129-center が *Rnt1-1* と共分離することが示された。129-2k 及び 129-center に挟まれる領域には R gene 様配列のクラスターが一カ所存在している。このクラスター内の R gene が *Rnt1-1* の候補遺伝子であると考えられた。一方、*TuRB01b* と *Rnt1-1* の関係については *Rnt1-1* に対して病原性を示す UK1-CIm を *TuRB01b* を有するハクサイ品種「Tropical Delight」に接種すると「Tropical Delight」は抵抗性を示したことから、*Rnt1-1* は *TuRB01b* とは異なる遺伝子であると考えられた。

(2) TuMV-UK1 の *Brassica rapa* に対する病徴決定因子

Rnt1-1 をホモ型で有している AS9 は UK1 に対して抵抗性を示すが、この抵抗性が打破されると全身えそを示す。この AS9 の感染葉を接種源として「優春」、「はやひかり」及び「早生大蕪」に機械接種を行なうと UK1 を接種した場合と異なる病徴が観察された。「優春」ではえそモザイクからマイルドなモザイクへ、「はやひかり」では奇形を伴う弱いえそモザイクからマイルドなモザイクへ質的な病徴の変化が生じた。「早生大蕪」ではモザイクからマイルドなモザイクへ病徴の程度が軽減した。この病徴変化を引き起こす UK1 突然変異系統を UK1m とした。

病徴変化に関与するウイルス因子を同定するため、UK1m の ORF を 4 つの領域において RT-PCR により cDNA を合成し、塩基配列を決定した。その結果、データベース上の UK1 の塩基配列と比較して 6 箇所の塩基置換が検出された。そのうち 2 つは、本研究室で継代している UK1 で生じた変異であり UK1 の最も 5' 側に位置する P1 遺伝子の最初の塩基を +1 とした場合、P1 遺伝子内の +363 の位置に生じた G→A、及び CI 遺伝子内の +4008 の位置に生じた T→C の同義置換であった。UK1m 特異的に検出された残り 4 箇所の塩基置換は、P3 遺伝子内の +3518 の位置に生じた T→C、6K1 遺伝子内の +3636 の位置に生じた G→A、CI 遺伝子内の +5480 の位置に生じた T→A、CP 遺伝子内の +9113 の位置に生じた T→C であった。このうち 6K1 遺伝子内の変異は同義置換であった。一方 P3、CI 及び CP 遺伝子内で生じた塩基置換はそれぞれアミノ酸配列が Val→Ala、Val→Glu 及び Val→Ala に変化する非同義置換であった。

いずれのアミノ酸変異が抵抗性打破や病徴変化に関与するのかを明らかにするため、site-directed mutagenesis によって UK1 感染性クローンにそれぞれ 1 つずつ変異を導入した。P3、CI 及び CP 遺伝子内で生じた塩基置換を導入した感染性クローンはそれぞれ UK1-P3m、-CIIm 及び -CPm とした。はじめに各感染性クローンを *N. benthamiana* に機械接種し、次にその感染葉を接種源としてハクサイ及びカブ品種・系統に対して接種試験を行った。その結果、UK1-CIIm 接種区でのみ UK1m 接種時と同様の抵抗性打破及び病徴変化が観察され、UK1-CPm 接種区では「早生大蕪」のみでわずかなモザイク病徴の程度の軽減が観察された。この結果から、CI における変異 (V1827E) が抵抗性打破及び病徴変化の主たる要因であると考えられた。

UK1-CIIm による「優春」、「はやひかり」及び「早生大蕪」における病徴が UK1 による病徴よりもマイルドになっているのは、CI への変異によってウイルスの複製や細胞間移行または長距離移行が阻害された結果である可能性が考えられた。これらについて明らかにするため、半葉接種法により UK1 及び UK1-CIIm を「早生大蕪」に接種し、接種葉における感染点の直径と感染点数の比較並びに非接種上位葉でのウイルス蓄積量の比較を行なった。UK1 と UK1-CIIm を同一の葉の葉脈を境に半分ずつ接種し、接種後 5 日目の接種葉を用いて tissue printing を行なった結果、感染点の大きさ及び数にウイルス系統間での統計的に有意な差は無く、変異による感染や細胞間移行への影響は無い、かなり小さいと考えられた。また、非接種上位葉での ELISA の結果から上位葉でのウイルス蓄積量にも差は無いことが示されたことから、変異

による複製能への影響も無いと考えられた。これらの結果より、「早生大蕪」の病徴が一樣にマイルドになったのはウイルスの変異によってウイルスの増殖・移行能力が低下し病原性が弱まったためではなく、CI 遺伝子における変異によって宿主との相互作用に変化が生じ、その結果として病徴が変化したものであることが明らかとなった。また、「優春」、「はやひかり」の UK1 及び UK1-CIIm 非接種上位葉におけるウイルス蓄積量を ELISA により比較した結果でもその傾向は変化しないことが示された。このことから変異による複製能への影響はないと考えられた。

(3) まとめ

本研究結果から、TuMV に感染したハクサイ・カブにおいて発症する様々な病徴は宿主、ウイルス双方の因子の相互作用によって誘導されることが明らかとなった。栽培上最も被害の大きいえそは、宿主側の抵抗性遺伝子座 *Rnt1* の対立遺伝子の一つ *rnt1-2* とウイルスの CI 遺伝子との相互作用によって引き起こされ、抵抗性の対立遺伝子 *Rnt1-1* も CI 遺伝子の変異によりえそを示す。このようにえそ誘導については抵抗性遺伝子が関わっており、これは抵抗性付与のために導入した抵抗性遺伝子がいったん打破されると逆に著しい被害をもたらす可能性があることを示唆している。また、*rnt1-2* は劣性変異であるためモザイクを誘導する *rnt1-3* とのヘテロ型では強いえそを誘導しないものの、葉脈に沿って生じる部分的なえそにより葉は著しく奇形化する。このため、育種においてはあらかじめ母本における抵抗性遺伝子の有無を明らかにし、圃場に分布する TuMV の系統によってはむしろ抵抗性遺伝子を除く方向で育種を進める必要がある。一方、モザイクやえそによらない奇形についても宿主、ウイルス双方に因子が存在し、ウイルス側の因子は CI 遺伝子であることが明らかとなった。宿主側の因子の同定までは至っていないが、今後この因子の解析を進めることにより育種の過程で取り除くことであれば、感染後の病徴がより軽微な品種の育成をすることが可能になると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

① Fujiwara A, Inukai T, Kim B and Masuta C. Combinations of a host resistance gene and the CI gene of *Turnip mosaic virus* differentially regulate symptom expression in *Brassica rapa* cultivars. Archives of Virology (査読有) (in press).

② Ohnishi S, Echizenya I, Yoshimoto E, Kim B, Inukai T and Masuta C. Multigenic system controlling viral systemic infection determined by the interactions between *Cucumber mosaic virus* genes and QTLs of soybean cultivar. *Phytopathology* (査読有) (in press).

③ Fujiwara A, Shimura H, Sano S, Inukai T and Masuta C. Screening of antiviral agents to inhibit RNA silencing suppressors of plant and animal viruses. *Proceedings of Antivirals congress* (査読有) P1.13 (2010)

④ Inukai T, Hirayama Y. Comparison of starch levels reduced by high temperature during ripening in Japonica rice lines near-isogenic for the *Wx* locus. *Journal of Agronomy and Crop Science* (査読有) 196:296-301 (2010).

⑤ Kim B, Suehiro N, Natsuaki T, Inukai T and Masuta C. The P3 protein of *Turnip mosaic virus* can alone induce hypersensitive response-like cell death in *Arabidopsis thaliana* carrying *TuNI*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* (査読有) 23:144-152 (2010).

⑥ Uchibori A, Sasaki J, Takeuchi T, Kamiya M, Tazawa A, Inukai T and Masuta C. QTL analysis for resistance to *Soybean dwarf virus* in Indonesian soybean cultivar Wilis. *Molecular Breeding* (査読有) 23:323-328 (2009).

⑦ Kim B, Masuta C, Matsuura H, Takahashi H and Inukai T. Veinal necrosis induced by *Turnip mosaic virus* infection in *Arabidopsis* is a form of defense response accompanying HR-like cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21:260-268 (査読有) (2008).

[学会発表] (計7件)

① 藤原 綾香・犬飼 剛・増田 税
*Brassica rapa*におけるTuMVに対するえそ誘導遺伝子座 *Rnt1* のマッピング

2011年度日本植物病理学会大会ポスター発表 (2011年3月27日、東京都府中市)

② Fujiwara A, Shimura H, Sano S, Inukai T and Masuta C

Screening of antiviral agents to inhibit RNA silencing suppressors of plant and animal viruses. *Antivirals congress* (November 7-9, 2010, Amsterdam, The Netherlands) ポスター発表

③ 藤原 綾香・犬飼 剛・増田 税
Turnip mosaic virus の CI タンパクは *Brassica rapa* において多様な病徴を誘導する

2010年度日本植物病理学会大会ポスター発表 (2010年4月18日、京都府京都市)

④ 藤原 綾香・金 甫珉・犬飼 剛・増田 税

カブモザイクウイルスに感染したハクサイにおける病徴決定因子

2009年度植物感染生理談話会ポスター発表 (2009年8月6日、北海道茅部郡森町)

⑤ 藤原 綾香・金 甫珉・犬飼 剛・増田 税

カブモザイクウイルスに感染したハクサイの病徴を決定する宿主及びウイルス因子

2009年度日本植物病理学会大会ポスター発表 (2009年3月26日、山形県山形市)

⑥ 犬飼 剛・増田 税

いもち病菌に感染したオオムギにおいて誘導される防御関連遺伝子のeQTL解析

2009年度日本植物病理学会大会口頭発表 (2009年3月26日、山形県山形市)

⑦ 藤原 綾香・金 甫珉・犬飼 剛・増田 税

カブモザイクウイルスに感染したハクサイにおける病徴決定因子の遺伝学的解析

2008年度日本植物病理学会北海道部会口頭発表 (2008年10月17日、北海道札幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

犬飼 剛 (INUKAI TSUYOSHI)

北海道大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：90223239

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

増田 税 (MASUTA CHIKARA)

北海道大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：60281854

(4) 研究協力者

藤原 綾香 (FUJIWARA AYAKA)

北海道大学・大学院農学院・特別研究員

(DC1)