

| | |
|----------|---|
| 氏名 | ふじ 藤 崎 恒 喜 |
| 学位(専攻分野) | 博 士 (農 学) |
| 学位記番号 | 農 博 第 1356 号 |
| 学位授与の日付 | 平成 15 年 3 月 24 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 |
| 研究科・専攻 | 農学研究科応用生物科学専攻 |
| 学位論文題目 | Analyses of interactions among plant and viral factors required for bromovirus infection (プロモウイルスの感染に必要なウイルス因子間、およびウイルス-植物因子間相互作用の解析) |
| 論文調査委員 | (主査) 教授 奥野哲郎 教授 遠藤 隆 教授 泉井 桂 |

論 文 内 容 の 要 旨

植物ウイルスの感染が成立するためには様々なウイルス因子と植物側の因子との相互作用が親和的であることが必要である。プロモウイルスは、最も研究の進んでいる植物ウイルスの1つであるが、ウイルス感染に関わる植物因子についてはほとんど知見が得られていない。その原因の1つとして今までプロモウイルスの研究に広く用いられてきた *Brome mosaic virus* (BMV) と *Cowpea chlorotic mottle virus* (CCMV) が植物因子の研究に有用なモデル植物シロイヌナズナに対して非常に弱い感染性しか示さないことがあげられる。そこで本研究では、シロイヌナズナ (accession Col-0) に効率よく全身感染するプロモウイルスを探索し、*Spring beauty latent virus* (SBLV) がシロイヌナズナに効率よく感染することを見いだした。この SBLV を用い、感染に関わる種々の因子間の相互作用について解析を行った。

第1章では SBLV のもつウイルス因子について分子レベルでの解析を行うため、まず *in vitro* で SBLV RNA を合成できる cDNA クローンを構築した。そして SBLV ゲノムの全塩基配列を決定し、本ウイルスの遺伝子操作系を確立した。

第2章では、SBLV、BMV、CCMV の間でゲノム RNA1、RNA2 および RNA3 を様々に入れ換えたゲノム交換体を作製し、それらの *Nicotiana benthamiana* における増殖能を調べ、プロモウイルスの感染に関わるウイルス因子間相互作用に関する解析を行った。プロモウイルスの細胞レベルでの増殖には RNA1 と 2 が同じウイルスに由来する必要があると考えられてきたが、SBLV の RNA2 は異なるプロモウイルスの RNA1 との組合せで RNA を蓄積した。一方、SBLV の RNA1 は異なるウイルスの RNA2 との組合せでウイルス RNA を蓄積できなかった。こうした SBLV RNA1 と RNA2 の特徴は、それぞれの RNA がコードする 1a、2a タンパク質が異なるウイルスの 1a、2a タンパク質と機能的な複製酵素を形成できるか否かによって決定されていることを DNA 発現ベクターを用いた実験で明らかにした。また CCMV の RNA2 を SBLV の RNA2 で交換したキメラウイルスは野生型の CCMV に比べて細胞間移行の効率が著しく低下した。このキメラウイルスと CCMV は 1 細胞レベルにおけるウイルス蓄積に顕著な差が認められないことから、プロモウイルスの細胞間移行の段階に、RNA2 に存在する因子が介在した新規の相互作用が関わっていることを示唆した。

第3章では Col-0 に対する BMV、CCMV、SBLV の感染性の違いに注目し、その感染性の違いを決定している機構について解析を行った。その結果、BMV と CCMV は 1 細胞レベルでの増殖能が SBLV よりも低いこと、また、ゲノム交換体を用いた実験から、少なくとも RNA1 と RNA2 がプロモウイルスの感染性決定に大きな役割を果たしていることを明らかにした。BMV と CCMV の低い感染性の原因について植物側の抵抗性の関与を調べるため、サリチル酸 (SA)、ジャスモン酸 (JA)、エチレン (ET) の介在する防御応答が変化しているシロイヌナズナ変異体におけるプロモウイルスの感染性を調べた。その結果、抵抗性を誘導できない変異体に対して、BMV と CCMV は野生型と同様に効率よく感染できなかったが、糸状菌や細菌に対する抵抗性が增大している *cpr5-2* 変異体において、効率よく全身感染することを明らかにした。*cpr5-2* 変異体における 1 細胞レベルでのウイルス増殖能力は BMV では増大していたが、CCMV では顕著な違いが認められなかった。さらに、BMV では RNA1 と 2 からの翻訳効率が *cpr5-2* 変異体において増大することを示唆した。*cpr5-2*

変異体では SA, JA/ET を介したシグナル伝達経路が恒常的に活性化していると考えられているが, *cpr5-2* 変異体におけるこれら経路の遮断は BMV の感染性に顕著な影響を示さなかった。

第4章ではシロイヌナズナのような様々なアクセッションに対する SBLV の感染性を調べ, SBLV の感染が Col-0 に比べて遅れる Pla-0 を同定した。1細胞レベルでの SBLV 増殖は Col-0 と Pla-0 との間で顕著な違いが認められず, また他のいくつかの植物ウイルスは Pla-0 に効率よく感染したことから, Pla-0 ではウイルスの移行の段階が SBLV で特異的に影響を受けていると考えられた。

第5章では SBLV は Col-0 など多くのアクセッションに対し, 無病徴だが S96 と Ei-2 に対しては病徴を示すことを明らかにした。SBLV は, S96 と Col-0 の植物体およびプロトプラストにおいて効率よく増殖し, 病徴の発現は SBLV 増殖とは独立した機構で成立していると考えられた。遺伝学的解析から病徴発現に関わる不完全優勢の核内遺伝子座 *SSB1* を第4染色体上にマッピングした。

以上の結果は, 本研究で確立したプロモウイルス感染のモデル系がウイルス因子間相互作用の解析のみならず, 植物とプロモウイルスとの相互作用の解析についても非常に有用であることを示すものである。

論文審査の結果の要旨

ウイルス感染に関与する植物側の因子はほとんど明らかにされていない。本論文では, プロモウイルス属の SBLV がシロイヌナズナに効率よく全身感染することを見だし, プロモウイルスの感染に関わる宿主因子の同定を視野に入れ, SBLV の遺伝子操作実験系を構築した。次に SBLV を含む3種のプロモウイルスを用い, 感染に関わるウイルス因子の相互作用を明らかにするとともに, SBLV を用いて数多くのシロイヌナズナ変異体やアクセッションをスクリーニングし, プロモウイルスの感染に関わるウイルス因子といくつかの宿主遺伝子についての研究をまとめたものである。本論文の評価すべき点は, 以下の通りである。

1. プロモウイルス属の SBLV がモデル植物であるシロイヌナズナに感染することを見だし, その遺伝子操作系を確立することによって, 植物因子の解析も視野に入れたプロモウイルス感染研究のモデル系を確立した。
2. SBLV, BMV, CCMV 間でゲノム交換体を作製し, SBLV の RNA2 は BMV や CCMV の RNA1 との組合せでもウイルス RNA を蓄積させることができることを発見した。また, ウイルスタンパク質を発現するベクターを用いた実験から, SBLV RNA2 の特徴は, RNA2 にコードされている 2a タンパク質が BMV や CCMV の RNA1 にコードされている 1a タンパク質と機能的な複製酵素を形成することができることに由来することを明らかにした。
3. SBLV と比べ BMV と CCMV がシロイヌナズナに対して低い感染性しか示さない原因は, BMV と CCMV の1細胞レベルでの増殖能力が低いこと, また, ゲノム交換体を用いた実験から, 少なくとも RNA1 と RNA2 がシロイヌナズナにおけるプロモウイルスの感染性決定に重要な役割を果たしていることを明らかにした。
4. サリチル酸 (SA), ジャスモン酸 (JA)/エチレン (ET) の介在する防御応答が変化しているシロイヌナズナ変異体における SBLV, BMV, CCMV の感染性を調べ, SBLV はいずれの変異体にも効率よく感染すること, BMV と CCMV は野生型と同様ほとんどの変異体に効率よく感染できないが, *cpr5-2* 変異体では効率よく全身感染することを発見した。また, SA, JA/ET を介したシグナル伝達経路が遮断された *cpr5-2* 変異体においても BMV の感染性は顕著に影響されず, BMV の感染性の増加は糸状菌や細菌に対する抵抗性の誘導とは異なる機構で成立していることを明らかにした。
5. *cpr5-2* 変異体における1細胞レベルでのウイルス増殖能力は BMV では増大していたが, CCMV では顕著な違いが認められなかった。さらに, BMV では RNA1 と 2 からの翻訳効率が *cpr5-2* 変異体において高まっていることを明らかにした。
6. SBLV をシロイヌナズナのような様々なアクセッションに接種して SBLV の感染が Col-0 に比べて遅れるアクセッション Pla-0 を同定した。この感染性の遅延は細胞間移行の段階で認められ, 今まで報告の少ない細胞間移行に関わる植物因子の解析に新たな道を開いた。
7. SBLV は Col-0 をはじめ, 多くのアクセッションに対して病徴を示さないが, 病徴が誘導される S96 を発見した。また, その病徴発現に関わる遺伝子座 *SSB1* を第4染色体上にマップした。

以上のように, 本論文は, プロモウイルス感染におけるウイルス因子間相互作用の解析からウイルス因子間の相互作用を

機能レベルで明らかにするとともに、ウイルスの細胞間移行および病徴発現に関わる宿主因子の同定に新たな道を開いた。さらに植物の微生物に対する抵抗性機構はウイルスに対する抵抗性機構と必ずしも同じでないことを明らかにした。また、本研究で確立したシロイヌナズナを用いたプロモウイルス感染のモデル系は、今後、宿主因子を含めた植物ウイルス感染機構の研究に非常に有効であると考えられることから、本論文は、植物病理学、ウイルス学、植物生理学並びに農学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成15年2月17日、論文並びにそれに関連した分野にわたり、試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。