

植物ウイルスの感染と
転写後型ジーンサイレンシングの研究

久保田 健嗣

目次

・ 要旨	3
・ 略語表	5
・ 序章	7
・ 第1章 ToMV の PTGS サプレッサーの同定と性質	
1.1 序論	10
1.2 材料と方法	15
1.3 結果	23
1.4 考察	32
・ 第2章 <i>Tobamovirus</i> によるモザイク病のパターン形成における PTGS の役割	
2.1 序論	38
2.2 材料と方法	40
2.3 結果	42
2.4 考察	45
・ 第3章 <i>Tobamovirus</i> 感染におけるクロスプロテクションのメカニズム	
3.1 序論	49
3.2 材料と方法	52
3.3 結果	55
3.4 考察	59
・ 結論と今後の展望	63
・ 謝辞	66
・ 引用文献	67
・ 図	80

要旨

近年発見された転写後型ジーンサイレンシング (posttranscriptional gene silencing, PTGS) は RNA を配列特異的に分解するプロセスであり、植物ではウイルス抵抗性としての役割をもつ。ウイルスの複製などによって生成された 2 本鎖 RNA が約 25 nt に切断されて small-interfering (si)RNA となり、siRNA を取り込んだ RNA-induced silencing complex (RISC) 複合体が、siRNA と相補的な 1 本鎖 RNA を分解する。

ウイルスの感染によって、植物には病徴の出現などさまざまな現象が生じる。多くのウイルスはサプレッサーと呼ばれるタンパクにより PTGS を抑制することができるが、その構造や作用メカニズムは互いに異なる。それまで原因がわからなかったウイルス感染におけるいくつかの現象が PTGS とサプレッサーの観点から説明可能となったことから、感染現象の理解のためには PTGS を考慮に入れた解析が必要だとの認識が広がっている。

この認識をふまえ、本研究では *Tobacco mosaic virus* (TMV)をはじめ *Tobamovirus* の感染でみられる現象を PTGS の観点から解明することを目的とした。最初に、それまで知られていなかった *Tobamovirus* の PTGS サプレッサーを同定することを試みた。GFP (green fluorescent protein) 遺伝子に対する PTGS が起きたタバコ *Nicotiana tabacum* に TMV や *Tomato mosaic virus* (ToMV)を感染させると GFP 蛍光が復活したことから、*Tobamovirus* は PTGS 抑制能をもつことが分かった。アグロインフィルトレーションアッセイにより、ToMV の複製酵素である 130K タンパクが単独でサプレッサー活性をもつことを明らかにした。siRNA 生成を完全には阻害しないことや、一度成立した PTGS は抑制できないことから、130K タンパクは PTGS 反応系のなかで siRNA が生成された後、新しく RISC が形成されるステップを阻害していることが示唆された。

TMV や ToMV はタバコにモザイク病を引き起こす。モザイク症状を呈した葉には緑色の濃淡斑が生じ、濃淡のパターンとウイルス局在のパターンはよく一致することが知られている。GFP の PTGS が抑制されたタバコでは、これに加えて GFP 蛍光のパターンもほぼ完全に一致していたことから、モザイクのパターン形成には PTGS が深く関与していることが予想された。解析の結果、ウイルスに対する PTGS シグナルの移行と、シグナルを受け取った細胞での PTGS の成立が、ウイルスの局在を決定することが示唆された。この知見をもとに、新たなパターン形成機構モデルを提唱した。

クロスプロテクションはウイルスが感染した植物が、それと近縁のウイルスに対して抵抗性となることをいう。そのメカニズムはまだ十分解明されていないものの、一部のクロスプロテクションは PTGS が原因であることが示されている。ToMV の弱毒株 L₁₁A が感染した植物はクロスプロテクションにより強毒株感染による発病を免れることが知られていた。また、サプレッサー解析の過程で L₁₁A は PTGS 抑制能が低下したウイルスであることが判明したことから、L₁₁A によるクロスプロテクションも PTGS に起因することが予想された。ToMV 感染におけるクロスプロテクションのメカニズムを探るために解析を進めたところ、ToMV に対するクロスプロテクションはウイルス感染後数時間以内に誘導され、1 細胞レベルでも起こることが明らかとなった。L₁₁A 感染植物におけるクロスプロテクションは PTGS だけでは説明できないことが示唆され、この結果をもとに ToMV が感染した植物におけるクロスプロテクションのメカニズムを考察した。

略語表

ウイルス名

AMV	<i>Alfalfa mosaic virus</i>
BSMV	<i>Barley stripe mosaic virus</i>
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CTV	<i>Citrus tristeza virus</i>
PMMoV	<i>Pepper mild mottle virus</i>
PRSV	<i>Papaya ringspot virus</i>
PVX	<i>Potato virus X</i>
PVY	<i>Potato virus Y</i>
TBSV	<i>Tomato bushy stunt virus</i>
TCV	<i>Turnip crinkle virus</i>
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
ToMV	<i>Tomato mosaic virus</i>
TRV	<i>Tobacco rattle virus</i>
TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus</i>
TYMV	<i>Turnip yellow mosaic virus</i>

その他

CP	coat protein
DGT	dark green tissue
dpi	days post inoculation
dsRNA	double-stranded RNA
GFP	green fluorescent protein

GUS	β -glucuronidase
HC-Pro	helper component-proteinase
hpi	hours post inoculation
miRNA	microRNA
MP	movement protein
NT	nontransgenic
PTGS	posttranscriptional gene silencing
RdRP	RNA-dependent RNA polymerase
RFP	red fluorescent protein
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	RNA interference
siRNA	small-interfering RNA
ssRNA	single-stranded RNA
VIGS	virus-induced gene silencing
YT	yellow tissue

序章

世界には 600 種以上の多様な植物ウイルスが存在する。ウイルスが宿主植物に感染すると細胞内で複製し、原形質連絡を介した細胞間移行と師管を介した長距離移行を経て、全身へ感染してゆく。全身感染した植物にはモザイクや萎縮といった全身病徴が生じる。

一方、植物はウイルス感染に対する種々の防御機構を備えている。ウイルス抵抗性はウイルスの増殖抑制、過敏感反応によるウイルスの局在化、長距離移行の阻害など様々のレベルでおこなうことが知られている。近年、転写後型ジーンサイレンシング (posttranscriptional gene silencing, PTGS) が新たなウイルス抵抗性機構として注目されるようになった (Hull, 2002)。

PTGS はもともと、内在遺伝子と相同な外来遺伝子を導入した形質転換植物において、内在、外来遺伝子の双方の発現が抑制される現象 (コサプレッション) から発見された (Napoli et al., 1990; Van Der Krol, et al., 1990, Smith et al., 1990)。転写されたあとの mRNA が分解されることで発現抑制がおきることから、PTGS と名付けられた。PTGS と同様の機構による RNA 分解現象は植物だけでなく動物や菌類にも存在し、RNA silencing と総称される。RNA silencing の反応は細胞内で 2 本鎖 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) が生成されることで始まる (Fire et al., 1998) (図 1 を参照)。Dicer と呼ばれる RNase が dsRNA を 21~23 nt の長さに切断し、small-interfering RNA (siRNA) を生成する (Hamilton and Baulcombe, 1999; Bernstein et al., 2001)。siRNA は RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる複合体に取り込まれる。RISC が siRNA と相補的な配列をもつ RNA を標的として認識し、切断することで、配列特異的な RNA の分解が起こる (Hammond et al., 2000)。植物の PTGS 反応については第 1 章序論で触れる。

RNA ウイルスは複製過程でマイナス鎖 RNA を合成するため、dsRNA を生成する可能性がある。また、DNA ウイルスから転写された 1 本鎖 RNA (single-stranded RNA, ssRNA) や、RNA ウイルスの ssRNA から、内在性 RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) の働きにより dsRNA が生産される。その結果ウイルスは自身に対する PTGS を誘導し、同時に PTGS による RNA 分解の標的となる。ウイルス抵抗性としての PTGS は、感染後に獲得され、多様なウイルスに適応でき、特異的である点で、動物の免疫のような機能をもつといえる (Waterhouse et al., 2001; Voinnet, 2001)。PTGS がウイルス抵抗性機構として重要

であることは、PTGS を起こせなくなったシロイヌナズナの変異体が *Cucumber mosaic virus* (CMV) に対して感受性が高まることや (Mourrain et al., 2000; Dalmay et al., 2001)、次に述べるように多くのウイルスが PTGS を抑制する能力を有することからも推察される。

ウイルス抵抗性としての PTGS があるにも関わらずウイルスは全身感染できる。これはウイルスが PTGS 抑制機能をもつサプレッサータンパクをコードしているためである (Voinnet et al., 1999)。現在までに 15 以上のウイルス属でサプレッサー遺伝子が同定されている。サプレッサーの配列や構造はウイルスごとに異なり、その作用メカニズムも様々である (第 1 章序論、図 2 を参照)。

上述のように PTGS の変異体ではウイルスに対する感受性が高まることや (Mourrain et al., 2000; Dalmay et al., 2001)、逆にサプレッサーに変異をもつウイルスは病原性が低下することから (Ding et al., 1995; Kasschau et al., 1997; Szittya et al., 2003)、PTGS とサプレッサーの力のバランスがウイルスの増殖、移行や病徴を大きく左右することが認知されるようになっていく。また、ウイルス感染植物が示す現象として古くから知られていたモザイク病徴 (第 2 章序論、Moore et al., 2001; Jorgensen et al., 1998) やリカバリー (第 2 章序論、Ratcliff et al., 1997; Covey et al., 1997)、クロスプロテクション (第 3 章序論、Ratcliff et al., 1999)、シナジズム (異種ウイルスの混合感染による劇症化、Pruss et al., 1997) などの原因を PTGS の観点から説明しようとする流れが生まれた。ウイルスの感染生理を理解するためには、PTGS を考慮に入れることが不可欠であるとの認識が広まっている。

本研究の開始以前、ウイルスと PTGS に関する研究は主に *Potyvirus*、*Cucumovirus* および *Potexvirus* を用いて行なわれていた。*Tobamovirus* 属のタイプ種である *Tobacco mosaic virus* (TMV) はウイルスとして最初に発見され、複製、移行、病徴発現や抵抗性などについてもっとも多く研究蓄積がある (Scholthof, 2004)。しかし PTGS の観点から行われた研究は、TMV が PTGS 抑制能をもつことを示した Voinnet ら (1999) の報告以外にほとんどなく、サプレッサーも同定されていなかった。私は *Tobamovirus* の感染と PTGS がどのような関係にあるのかを知りたいと考えた。TMV や ToMV 感染状況のもとでおこる諸現象はすでに多くの解析がなされているが、もう一度 PTGS の側面から調べ直すことで、植物ウイルスの感染生理に関する新たな知見が得られると考え、博士課程の研究テーマとして選択した。

最初の目標として、*Tobamovirus* の PTGS サプレッサーを同定することを試みた。TMV と同属の *Tomato mosaic virus* (ToMV) の弱毒株を用いた解析から、PTGS サプレッサーが複製酵素の 130K タンパクであることを同定し、その作用機構についても解析を行なった (第

1 章)。

さらに、この過程で得られた知見をもとに、*Tobamovirus* がタバコに引き起こすモザイク病徴に焦点をあて、その形成に PTGS が果たす役割について解析した。その結果、PTGS はこれまで提唱されていたのとは違ったメカニズムでモザイクのパターンを形成するとの結論を得た (第 2 章)。

クロスプロテクションは植物ウイルス学のみならず農業への応用にとっても重要な現象であり、そのメカニズムは長年にわたり解析されてきたもののいまだに推測の域を出ていない。最近、一部のクロスプロテクションは PTGS によって説明できるとの報告がなされている。*Tobamovirus* 感染におけるクロスプロテクションのメカニズムを解明することを目的として解析を行なった結果、*Tobamovirus* によるクロスプロテクションは PTGS だけでは説明できないことが強く示唆された (第 3 章)。

第1章 ToMV の PTGS サプレッサーの同定と性質

1.1 序論

序章で述べたように、植物の PTGS 反応系の中心部分は動物や菌類とほぼ共通すると考えられているが、植物だけに見られる特徴もいくつか存在する (図 1)。

植物では dsRNA は、量的あるいは質的になんらかの異常な特性をもつ ssRNA が鋳型となり、RdRP によって生み出されると考えられている。シロイヌナズナでは ssRNA からの dsRNA の生成には、RdRP である *SDE1/SGS2/RDR6* および RNA ヘリカーゼと予想される *SDE3* が関与する (Dalmay et al., 2000; Mourrain et al., 2000; Dalmay et al., 2001)。

シロイヌナズナには 4 つの Dicer ホモログ (*DCL1*~*4*) があり、*DCL2* と *DCL3* が siRNA の生成に関わっているとされる (Schauar et al., 2002; Xie et al., 2004)。動物の siRNA は約 21~23 nt の長さであるが、植物には約 21~23 nt の「短い」クラスの他に約 25 nt の「長い」クラスの siRNA が存在し (Hamilton et al., 2002)、それぞれ別の DCL 活性により生成される (Tang et al., 2003)。

RISC については、コムギ胚芽の細胞質抽出物から *in vitro* での RISC 活性 (ssRNA 切断活性) が検出されているが、その構成因子は植物ではいまだ同定されていない (Tang et al., 2003)。動物では Argonaute ファミリーの Ago2 が RISC の RNA 切断活性を担う構成因子であることが明らかにされており (Liu et al., 2004)、シロイヌナズナの同ファミリーに属する *AGO1* の変異体も PTGS を起こさない表現型を示す (Fegard et al., 2000)。

線虫では、内在性 RdRP により siRNA をプライマーとして dsRNA の再合成が行われる (Sijen et al., 2001)。植物ではそれに加えプライマーに依存しない RNA 合成経路もあり、どちらも dsRNA の増幅によって PTGS 反応の強化に寄与すると想像されている (Baulcombe, 2004)。

植物では体の一部で起きた PTGS は、シグナル分子が原形質連絡を介した細胞間移行と師部を介した長距離移行することにより、全身に拡大する (Palauqui et al., 1997; Voinnet and Baulcombe, 1997)。シグナル分子の実体はいまだ明らかではないものの、siRNA またはそれに類する核酸であると予想されている (Mlotshwa et al., 2002)。短いクラスの siRNA の蓄積は PTGS の細胞間移行に、長いクラスの siRNA の蓄積は全身性の PTGS に相関がある

(Himber et al., 2003; Hamilton et al., 2002)。最近、PTGS を起こしているカボチャの一種 *Cucurbita pepo* において、siRNA が篩管に入り、長距離移行することが報告された (Yoo et al., 2004)。

RNA silencing の生物学的役割のひとつはトランスポゾンやウイルスなど「異質な遺伝子」の抑制であると推測されており、植物の PTGS の主要な役割もウイルス感染に対する抵抗性であると考えられている (Plasterk, 2002)。RNA ウイルスが感染した細胞では、ウイルス ssRNA が質的あるいは量的に異常な RNA として認識され、宿主の RdRP によって dsRNA に転換されることで生成する (図 1)。この結果、ウイルス感染によってウイルス配列に対する PTGS が誘導される。また、dsRNA の再生産は RISC や PTGS シグナルを増加させるのに役立ち、PTGS の全身移行はウイルスの感染拡大に先立って抵抗性を誘導するのに役立っていると考えられる。

ウイルスは PTGS への対抗手段として PTGS 抑制タンパク (サプレッサー) を備えていることが、最近の研究で明らかになった (Voinnet et al., 1999)。サプレッサーの同定および機能解析には、大きく分けて 3 つの手法が用いられてきた。最初に用いられたのはサプレッサーの形質転換体による解析である。Anandalakshmi ら(1998)と Kasschau ら(1998)は、*Potyvirus* の一種である *Tobacco etch virus* (TEV) の HC-Pro 遺伝子の形質転換タバコを作出した。このタバコと、 β -glucuronidase (GUS) 遺伝子の PTGS が起きている形質転換タバコとを掛け合わせると、PTGS が解除されて GUS の発現が復活することから、HC-Pro が PTGS 抑制能をもつことを示した。これよりも簡便で応用範囲の広い手法としてアグロインフィルトレーションアッセイがある。green fluorescent protein (GFP) を形質転換した *Nicotiana benthamiana* の葉に、GFP 遺伝子を挿入した Ti プラスミドをもつアグロバクテリウムを注入して一過的に GFP を発現させると、注入部位で GFP 遺伝子に対する PTGS が誘導され、PTGS 状態は上位葉にも広がってゆく (Voinnet and Baulcombe, 1997; Voinnet et al., 1998)。しかしサプレッサーも同時に発現させると、PTGS が抑制され GFP の発現が持続する (Voinnet, 2001; Johansen and Carrington, 2001)。第 3 の手法は silencing reversal assay などと呼ばれる。PTGS を起こしている植物にウイルスを接種し、感染によって遺伝子の発現が復活してくればそのウイルスは PTGS 抑制能をもつと判断される。この手法が上記 2 つと異なるのは、実際にウイルスが感染している状況で PTGS 抑制を解析する点である。Brigneti ら(1998) は GFP に対する PTGS を誘導した *N. benthamiana* に *Potato virus Y* (PVY) または *Cucumber mosaic virus* (CMV) を接種すると GFP 蛍光が復活してくること、また *Potato virus X* (PVX)

ベクターを接種しても GFP 蛍光は復活しないが、PVY の HC-Pro または CMV の 2b を発現する PVX ベクターを接種すると蛍光が復活することから、これらをサプレッサーとして同定した。同様に Voinnet ら(1999)は種々のウイルスが PTGS 抑制能をもつことを報告した。これらの手法に分子生物学的な解析を組み合わせることでサプレッサー機能の研究が行われ、そのメカニズムは多種多様であることが分かってきた(図 2)。

サプレッサーとして分子機構の解明が最もすすんでいるのは *Tombusvirus* 属の p19 である。p19 は *in vitro* および *in vivo* で 2 本鎖 siRNA に特異的に結合する活性をもち、siRNA を隔離して RISC に利用されないようにすることで PTGS を抑制すると考えられている (Silhavy et al., 2002; Lakatos et al., 2004)。

p19 以外のサプレッサーでは分子レベルでの作用機構は未だ明らかにされていないが、おもにアグロインフィルトレーションアッセイでの PTGS を抑制する様式や siRNA の蓄積などから、その機構が推測されている。

CMV の 2b および PVX の移行タンパクの一つである p25 は、アグロインフィルトレーションアッセイにおいて局所的 PTGS は抑制できないが、上位葉での PTGS 誘導は抑制することから、PTGS シグナルの生成または全身移行を阻害すると考えられている (Guo and Ding, 2002; Voinnet et al., 2000)。

Turnip crinkle virus (TCV)の外被タンパクである CP は、PTGS の開始は抑制するが一度成立した PTGS を抑制できないことや、アグロインフィルトレーションアッセイで siRNA の蓄積がほとんどなくなることから、PTGS 反応系の上流のステップ (Dicer 活性など) を阻害すると推測されている (Qu et al., 2003; Thomas et al., 2003)。

Potyvirus の HC-Pro の解析ではアッセイ系ごとにことなる結果が得られており、これは HC-Pro のもつ多機能性を反映していると思われる。HC-Pro を発現する形質転換タバコでは siRNA が消失することから、HC-Pro は siRNA の生成阻害を介して PTGS を抑制すると考えられた (Llave et al., 2000; Mallory et al., 2001, 2002)。しかし HC-Pro 形質転換シロイヌナズナでは siRNA は減少するものの消失せず、RISC 活性または新規 RISC の形成を阻害するのではないかと予想されている (Dunoyer et al., 2004; Chapman et al., 2004)。さらに silencing reversal assay やアグロインフィルトレーションアッセイにおいて、いったん成立した PTGS を解除できたことは (Brigneti et al., 1998; Llave et al., 2000)、既存の RISC 活性も阻害できることを示唆する。アグロインフィルトレーションアッセイにおいて、全身性 PTGS と相関している長いクラスの siRNA のみ消失させることから、全身性シグナルの

生成を阻害するとも推測されている (Hamilton et al., 2002)。

本研究では、PTGS サプレッサーが同定されておらずその作用機構も不明であった *Tobamovirus* について、PTGS 抑制能を解析することにした。*Tobamovirus* は TMV をタイプメンバーとする。長さ 6.4 kb のプラス鎖の ssRNA をゲノムとし、長さ 300 nm、直径 18 nm の棒状の粒子を形成する (図 3A, B)。ゲノムは少なくとも 4 つの遺伝子をコードしている (図 3C)。130K タンパクと、その終止コドンを読み過ぎた (リードスルー) 産物である 180K タンパクは、ゲノム RNA とサブゲノム RNA を合成する複製酵素であり、ゲノム RNA を mRNA として翻訳される。細胞間移行に必要な移行タンパク (movement protein, MP) と、粒子形成や長距離移行に関わる外被タンパク (coat protein, CP) は、それぞれのサブゲノム RNA から翻訳される。

TMV や ToMV はタバコやトマトに感染してモザイク症状を引き起こす。モザイクについては第 2 章で詳しく述べるが、モザイク症状が現れた葉には緑色の濃淡が生じ、ウイルスは淡緑色の領域に局在することが知られている。

ToMV には野生型株より弱い病徴しか生じさせない株 (弱毒株) がいくつか知られている。そのうち ToMV-L₁₁ および ToMV-L₁₁A 株は病原性が非常に弱い弱毒ウイルスである。L₁₁ は、野生型株である ToMV-L を感染させたトマトの茎を高温処理し、弱毒性を指標にした選抜により得られた (大島ら, 1965)。L₁₁A は L₁₁ から、より復帰変異株の現れにくい株を選抜して得られた (後藤と根本, 1971)。L₁₁ および L₁₁A はタバコでも全身感染し、ほぼ無病徴である (後藤と根本, 1971)。また、植物体における増殖量は L の約 5 分の 1 である。序章で述べたように PTGS サプレッサーがウイルスの増殖や病徴に関わっている例が多いことから、ToMV のこれらの弱毒株の PTGS 抑制能を解析することは、PTGS と病徴発現の関係の理解につながると考えられた。

まず、ToMV によるモザイク病徴と PTGS 抑制能とがどのように関わっているのかを明らかにしたいと考えた。この目的には、ウイルスが感染した状況下での PTGS 抑制を観察できる silencing reversal assay が適している。Voinnet ら(1999)は、GFP 遺伝子に対する全身性 PTGS を誘導した *N. benthamiana* に TMV を感染させると、葉脈に沿って GFP の蛍光が観察され GFP mRNA 量も増加することから、TMV が PTGS を抑制する能力をもつことを報告した。しかし、*N. benthamiana* は野生型 TMV や ToMV を接種するとモザイクではなく全身壊疽を生じるため (Canto et al., 2004)、モザイクなどの病徴発現と PTGS との関係を記述することは不可能である。そこで、GFP 遺伝子に対する PTGS が自発的に起こる

形質転換タバコ (*N. tabacum*) を作出し、ToMV 感染による病徴と GFP 蛍光の復活を観察した。その結果、ToMV 感染において PTGS 抑制能は病徴発現とカップルした形で発揮されることが分かった。次に、弱毒株の解析を通じて ToMV のサプレッサーの同定および作用機構の解析を行った。アグロインフィルトレーションアッセイによって ToMV の複製酵素である 130K タンパクは単独で PTGS 抑制能をもつことを示した。ToMV 感染植物の siRNA や RISC 活性を解析した結果から、130K タンパクは siRNA から新しく RISC が形成されるステップを阻害することを明らかにした。

1.2 材料と方法

プラスミドの構築

(1) ウイルス RNA を試験管内転写により作製するためのプラスミド

・ pTLW3、pTLJA1、pTLJ、pTLA

pTLW3 は、pUC18 の *Pst*I と *Eco*RI サイトの間に、T7 プロモーター、pLFW3 (Meshi et al., 1986) の ToMV-L の全長 cDNA、およびリンカー配列が挿入されたプラスミドである。ToMV-L₁₁A の全長 cDNA を含む pLFA1 (Meshi et al., 1986) を *Bst*XI/*Acc*III 消化して得られる約 2.93 kb の断片を pTLW3 の *Bst*XI-*Acc*III 部位に挿入して pTLJA1 を作製した。pTLW3 および pTLJA1 を *Nhe*I-*Kpn*I 消化して得られる約 2.47 kb の断片を入れ換えることにより、pTLJ および pTLA を作製した。

・ pTLBN.G3、pTLBN.G3(J)

pL.G3 (Tamai and Meshi, 2001b) を *Kpn*I/*Bst*EII 消化して得られる約 1.41 kb の断片を pTLW3 の *Kpn*I-*Bst*EII 部位に挿入して pTL.G3-*Bst*EII を得た。pTLW3 を *Nco*I 消化して平滑化し *Mlu*I 消化して得られる約 0.92 kb の断片を、pTL.G3-*Bst*EII を *Bst*EII 消化後末端平滑化し、*Mlu*I 消化した部位に挿入して、pTLBN.G3 を作製した。pTLBN.G3 を *Kpn*I/*Mlu*I 消化して得られる約 3.0 kb の断片を pTLJ の *Kpn*I-*Mlu*I 部位に挿入して pTLBN.G3(J) を作製した。

・ pTLBN.R1

pTLdCII は pTLW3 の CP 遺伝子の開始コドン ATG (5704 nt) を AGA に変異させ、さらに CP 遺伝子の 3'側 430 塩基 (5753 nt~6182 nt) を欠失させて *Bst*EII 部位を挿入したプラスミドである。pTopo-DsRd は、単量体で蛍光を発する red fluorescent protein (mRFP) (Campbell et al., 2002) のアミノ酸配列はそのまま、植物のコドン用法に最適化した改変遺伝子をコードするプラスミドである (津田新哉博士より分与)。pTopo-DsRd を鋳型として *Bst*EII-DsRd/1fw および *Bst*EII-DsRd/678rv プライマー (下、制限酵素部位を下線で示す。以下同様) を用いた PCR により得られる改変 RFP 遺伝子をコードする断片を *Bst*EII 消化して、pTLdCII の *Bst*EII 部位に挿入して pTL.DsRd を得た。pTL.DsRd を *Nsi*I 消化、平滑末端化、*Kpn*I 消化して得られる約 2.1kb の断片を pTLW3 の *Nco*I 消化、末端平滑化、

KpnI 消化した部位に挿入して pTLBN.R1 を作製した。ToMV-RFP の感染性トランスクリプトを作製するための鋳型として用いた。

BstEII-DsRd/1fw 5'-ACCGGTAACCATGGCTTCCTCCGAGATGT

BstEII-DsRd/678rv 5'-ACCGGTTACCTTAAGCACCAGTGGAATGCC

- pTX.erG3、pTX.GUS

piX.erG3 (Tamai and Meshi, 2001a) を *ApaI/XhoI* 消化して得られる断片を pP2C2S (Baulcombe et al., 1995) の *ApaI-XhoI* 部位に挿入して pTX.erG3 を作製した。pBI121 (Clontech) を *SmaI/SacI* 消化して得られる GUS 遺伝子をコードする断片を pP2C2S の *SalI* 消化後末端平滑化した部位に挿入して pTX.GUS を作製した。

(2) 形質転換およびアグロインフィルトレーションのためのバイナリーベクター

- pBI121-erG3

erG3GFP は N 末端にシグナルペプチドと小胞体リテンションシグナルをもつ G3GFP (Kawakami and Watanabe, 1997) をコードする。pBIerG3 (Tamai and Meshi, 2001b) を *XbaI/SacI* 消化して得られる erG3GFP をコードする約 0.8 kb の断片を pBI121 の *XbaI-SacI* 部位に挿入して pBI121-erG3 を作製した。

- pBI-L130NRT、pBI-L130J、pBI-L130FS、pBI-L180K(R2)

pBI-L130NRT は pBI121 の *XbaI-SacI* 部位に ToMV の 130K 遺伝子が挿入されたプラスミドである。130K の終止コドンは read through しやすいため、終止コドンをもう一つ付加した。pTLJ を *XbaI/ApaI* 消化して得られる約 2.0 kb の断片を pBI-L130NRT の *XbaI-ApaI* 部位に挿入して pBI-L130J を作製した。pBI-L130NRT を *XbaI* 消化、末端平滑化してセルフライゲーションさせることにより、pBI-L130FS を作製した。pLFR2 (Ishikawa et al., 1986) を *NheI/KpnI* 消化して得られる約 2.4 kb の断片を pTL.MR (Tamai et al., 2003) の *NheI-KpnI* 部位に挿入して pTL.MR.R2 を作製した。pTL.MR.R2 を *XbaI/SacI* 消化して得られる約 5.0 kb の断片を pBI-L130NRT の *XbaI-SacI* 部位に挿入して pBI-L180K(R2) を作製した。

- pMD1-PVY-HCPro、pMD1-TSWV-NSs、pMD1-TMV-p126、pBI-X25K

pMD1 は pBI121 由来の、クローニングサイトが改変されたプラスミドである (Barbara Baker 博士より分与)。pMD1-PVY-HCPro、pMD1-TSWV-NSs および pMD1-TMV-p126 はそれぞれ PVY-O 系統の HC-Pro 遺伝子、*Tomato spotted wilt virus* (TSWV) の NSs 遺伝子および TMV の p126 遺伝子が 35S プロモーターと Nos ターミネーターの間に挿入されている (津田新哉博士より分与)。pBI-X25k は、PVX の p25 をコードする p35X25k (Tamai and Meshi, 2001a) を *HindIII/EcoRI* 消化して得られる約 1.7 kb の断片を pBI121 の *HindIII-EcoRI* 部位に挿入して作製した。

(3) RNA プローブを作製するためのプラスミド

・ pSK-erG3、

pBlerG3 を *SacI* 消化、末端平滑化、*XbaI* 消化して得られる約 0.8kb の断片(erG3GFP 全長をコードする) を pBluescriptII SK+ (Stratagene) の *XbaI-EcoRV* 部位に挿入して作製した。

・ pbLAB

pTLW3 を *AatII* 消化、末端平滑化、*BamHI* 消化して得られる断片 (ToMV ゲノムの 3'側の約 0.7kb に相当する cDNA) を、pBluescript SK+ の *EcoRV-BamHI* 部位に挿入して pbLAB を作製した。

形質転換植物の作出

形質転換は Grayburn (1997) の方法により行った。pBI121-erG3 を保持したアグロバクテリウム LBA4404 株を *Nicotiana tabacum* cv. Samsun および *N. benthamiana* のリーフディスクと共存させてカルス誘導し、再生個体から種子を得た。トランスジーンをホモにもつ T3 個体を主に実験に使用した。*N. tabacum* の形質転換ラインである G3Sm1 はトランスジーンを 1 遺伝子座にもち、G3Sm2 は少なくとも 3 遺伝子座にもつ。*N. benthamiana* の形質転換ライン G3Nb3 はトランスジーンを 1 遺伝子座にもつ。

GFP 蛍光および RFP 蛍光の観察

GFP 蛍光の観察には蛍光実体顕微鏡 MZ-FLIII (Leica) を用い、フィルターセットは GFP Plant (Leica, excitation filter 470/40 nm, barrier filter 525/50 nm) を用いた。画像は CCD カメラ

DXM1200 (Nikon) またはズームレンズ Zoom-Micro Nikkor (Nikon) を装着した CCD カメラ DC500 (Leica) により取り込んだ。あるいは、FITC フィルター24902 (Volpe AG) を取り付けしたハロゲンランプ Intralux 6000-1 (Volpe AG) によって青色光を植物体に照射し、カットフィルターSC52 (富士写真フィルム) を取り付けしたデジタルカメラ Camedia E-20 (Olympus) を用いて約 1 分間の露光により蛍光を撮影した。

RFP 蛍光の実体顕微鏡観察には MZ-FLIII (Leica) と DsRED フィルター (Leica, excitation filter 546/12 nm, barrier filter 560 LP nm) を用いた。

画像処理は Photoshop (Adobe) を用いた。

GUS 染色

GUS 染色は Martin et al.(1992)の方法に従った。ウイルス接種したタバコ葉を GUS 染色液[50 mM sodium phosphate (pH7.0)、0.1% Triton X-100、1 mM X-Gluc]中に浸し、陰圧処理して液を浸透させた。37°Cで一晩処理し、エタノール中に浸してクロロフィルを脱色し観察した。

アグロインフィルトレーションアッセイ

アグロインフィルトレーションは Erickson et al. (1999)の方法に従った。各プラスミドを保持したアグロバクテリウム C58C1/pGV2260 株を LB 培地で震盪培養し、集菌してアグロインフィルトレーション培地 [1x MS salts、3.9 g/l MES、20 g/l sucrose、10 g/l glucose、200 μ M acetosyringone、pH5.4 (KOH)] に 600 nm での O.D.が 1.0 となるように懸濁した。GFP およびサプレッサーのコンストラクトを保持するアグロバクテリウム懸濁液を 1:2 の比で混合し、シリンジで *N. benthamiana* の葉の細胞間隙に注入した。トランスフォーメーションの効率を高めるため植物体を 22°Cで一日おいた後、22°Cまたは 28°Cに一定の日数おき、観察とサンプリングを行った。

サザンブロット解析

非形質転換タバコ、G3Sm1 および G3Sm2 の展開葉から CTAB 法によりゲノム DNA を抽出した。10 μ g のゲノム DNA を *Hind*III 消化して、0.9% TAE アガロースゲルで泳動後、Hybond-N+ (Amersham Biosciences) へ 0.4 M NaOH で 16 時間アルカリトランスファーした。メンブレンをハイブリダイゼーション溶液[5x SSPE, 5x Denhardt's solution, 0.5% sodium

dodecyl sulfate (SDS), 20 μ g/ml salmon sperm DNA]中で、65°Cで一晩保温してプレハイブリダイゼーションを行った。プローブは、erG3GFP 全長をコードする DNA を鋳型とし、Rediprime Random Prime Labelling System (Amersham Biosciences)によって 32 P-dCTP 標識して作製した。プローブを加えて 65°Cで一晩保温してハイブリダイゼーションを行った。メンブレンを 2x SSC で 65°Cにて 3 回洗浄後、オートラジオグラフィーを行った。

BY2 プロトプラストへの感染とノーザンブロット解析

ウイルス RNA のプロトプラストへの接種は基本的に Watanabe et al. (1987a)の方法に従った。植え継ぎ 3 日後の BY2 培養細胞から得たプロトプラストを用いた。800 μ l のエレクトロポレーションバッファー[5 mM MES、70 mM KCl、0.3 M D-mannitol、pH 5.8 (KOH)]に懸濁した 1,000,000 個のプロトプラストに、接種源である感染性トランスクリプトを 20 μ l 加え、GenePulser (Bio-Rad) を用いて電気パルス[0.3 kV、100 Ω 、125 μ F]を与えた。氷上に 30 分、30°Cで 5 分静置した後、120xg、3 分間の遠心によりプロトプラストを沈降させて上清を除いた後、10 ml のプロトプラスト培地[4.6 g/l MS 塩類(和光純薬)、0.2 mg/l 2,4-D、0.4 M D-mannitol、1% D-sucrose、100 mg/l myo-inositol、1 mg/l thiamine-HCl、pH 5.8 (KOH)]に懸濁し、暗所下、26°Cで培養した。8 または 20 時間培養後、TRIzol LS reagent (Invitrogen)を用いて全 RNA を精製し、ノーザンブロットに用いた。

mRNA およびウイルス RNA のノーザンブロット解析

葉のサンプルは液体窒素中で粉砕したのち、TRIzol reagent (Invitrogen)を用いて全 RNA を精製した。RNA サンプルをグリオキサール処理で変性した後 1%アガロースゲルで電気泳動し、ナイロンメンブレン Hybond-N (Amersham Biosciences)にブロットした。GFP mRNA を検出する DNA プローブは erG3GFP の *Eco*RI-*Cla*I 断片を鋳型として Rediprime II Random Prime Labelling System (Amersham Biosciences)を用いて作製した。ToMV RNA を検出するプローブは *Hind*III 消化した pT732 (Ishikawa et al., 1991a) を鋳型として T3 RNA ポリメラーゼにより試験管内転写して作製した。Hamilton and Baulcombe (1999)の方法によりプレハイブリダイゼーションとハイブリダイゼーションを行った。

siRNA のノーザンブロット解析

siRNA の検出は基本的に Hamilton and Baulcombe (1999)の方法に従った。低分子量 RNA

を精製するため、全 RNA を 5% polyethylene glycol (PEG) 8000 および 0.5 M NaCl の存在下で PEG 沈殿を行い、高分子 RNA を沈殿させて除去した。PEG 沈殿の上清をエタノール沈殿して得られた低分子量 RNA をホルムアミドにとかしてサンプルとし、15%ポリアクリルアミド-7M 尿素ゲルで電気泳動した。マーカーには 5'末端を放射性標識した 25 nt および 20 nt の合成オリゴ RNA を用い、一部の実験では 3'末端を標識した同じ配列の DNA をマーカーとした。(DNA マーカーは RNA マーカーより約 1 nt 速く泳動された。) 泳動後、ナイロンメンブレン Hybond-NX (Amersham Biosciences)に電氣的にブロットした。ブロットは Trans-Blot Cell (Bio-Rad)を用い、0.5x TBE 中で 100V、45 分間行った。ブロット後のメンブレンを 20x SSC 中で 30 分間平衡化し、80°Cで 2 時間風乾し、UV クロスリンクした。メンブレンをハイブリダイゼーション溶液[0.7% SDS, 50 mM sodium phosphate (pH 7.2), 0.3M NaCl, 5x Denhardt's solution, 45% formamide, 100 μ g/ml salmon sperm DNA]中で、40°Cで 2 時間以上保温してプレハイブリダイゼーションを行った。[α -³²P] CTP で標識した RNA プローブ (50~100 nt にアルカリ分解したもの) を 1,000,000 cpm/ml となるよう加えて 40°Cで一晩ハイブリダイゼーションを行った。40°Cの 2x SSC 中で 3 回洗浄した後、放射性シグナルを Typhoon 8600 (Amersham Biosciences)または Molecular Imager FXpro (Bio-Rad)により検出した。リプロービングする際にはメンブレンを 10 mM Tris-HCl (pH7.5)、0.2% SDS 中で煮沸することによりプローブをはがした後、プレハイブリダイゼーションとハイブリダイゼーションを繰り返した。

RT-PCR

TLBN.G3 または TLBN.G3(J)の感染性トランスクリプトを接種して 6 日後の G3Sm1 タバコの接種葉を蛍光実体顕微鏡下で観察し、GFP 蛍光を発するウイルス感染部位を金属管 (直径 2 mm) を用いてくりぬいた。TRIzol reagent (Invitrogen)を用いて全 RNA を回収し、Ready-to-Go RT-PCR beads (Amersham Biosciences)を用いて cDNA を合成した。cDNA 合成のプライマーは mRNA にはオリゴ(dT)₁₂₋₁₆ を用い、ToMV RNA には ToMV のプラス鎖の 3'末端に相補的なプライマーLB1 を用いた。PCR は ExTaq (Takara Bio)を用い、94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分のサイクルで、erG3GFP mRNA と ToMV RNA の検出には 22 サイクル、アクチン mRNA の検出には 35 サイクル行なった。プライマーの配列を以下に示す。

ToMV の cDNA 合成

LB1 5'-TGGGCCCCAACCGGGGGTTC

ToMV cDNA の増幅

L5300fw 5'-CCCAAATTACGGTATTACAACAAAGGATGC

G3rv1 5'-TGTGGGAGTTGAAGTTGTATTCCAA

erG3GFP cDNA の増幅

erG3/1fw 5'-ATGAAGACTAATCTTTTCTCTTTCTCATC

erG3/792rv 5'-TTAAAGCTCATCATGTTTGTATAGTTCATC

アクチン cDNA の増幅

AC1 5'-ATGGCAGACGGTGAGGATATTCA

AC2 5'-GCCTTTGCAATCCACATCTGTTG

タンパク解析

葉組織を 10 倍量の 100 mM Tris-HCl (pH6.8)-4% SDS-12% 2-mercaptoethanol 中で摩砕した。130K タンパクの検出の際にはプロテアーゼインヒビター CompleteMini (Roche-Boehringer)を加えた。遠心後、上清をボイルし、等量の 20% グリセロールを加えた。CP の検出には 15% SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE)後、ゲルをクマジーブルー染色した。GFP と 130K タンパクの検出にはそれぞれ SDS-12.2% および SDS-7.5% PAGE 後、タンパクを polyvinylidene difluoride (PVDF)メンブレンにブロットした。メンブレンを 1 次抗体であるウサギ抗 GFP 抗体 (Clontech) またはウサギ抗 130K タンパク抗体 (Hagiwara et al., 2003) で処理後、2 次抗体として horse radish peroxydase conjugated anti-rabbit IgG antibody (Amersham Biosciences)で処理した。バンドを ECL Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences)で検出した。

ウイルスおよび感染性トランスクリプトの接種

ToMV は野生型株の L (Ohno et al., 1984)と、L に由来する弱毒株の L₁₁ および L₁₁A (Nishiguchi et al., 1985)を使用した。MluI 消化した pTL-シリーズのプラスミド (ToMV) ま

たは *SpeI* 消化した pTX-シリーズのプラスミド (PVX) を鋳型とし、T7 RNA polymerase によって試験管内転写して感染性トランスクリプトを作製した。*N. tabacum* の葉に接種して増殖させた後、ウイルス粒子を精製して接種源とした。一部の実験では感染性トランスクリプトをタバコまたは *N. benthamiana* に接種してウイルスを増殖させ、ウイルス粒子を含む植物の摩砕液を接種源とした。接種はカーボランダム粉末を葉に振りかけ、ウイルス溶液を約 20 μ l おいた後、滅菌したガラス棒でこすることにより機械接種した。

植物の栽培

本実験では *N. tabacum* および *N. benthamiana* を用いた。とくにことわらない限り 16 時間明、8 時間暗、26°C または 28°C の条件で栽培した。

1.3 結果

GFP 形質転換タバコの性質

Cauliflower mosaic virus (CaMV)の 35S プロモーター下流に GFP 遺伝子を挿入したコンストラクト (35S/GFP と表記する、図 5A) を導入した形質転換タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) を作出した。G3GFP は野生型 GFP にアミノ酸置換を導入して強い蛍光を発し、紫外光では励起されず青色光でのみ励起される (Kawakami and Watanabe, 1997)。本研究では原形質連絡を介した細胞間移行が起こらない小胞体局在型の erG3GFP (Tamai and Meshi, 2001b) を用いた。作出した形質転換ラインのうち、生長に伴って GFP 蛍光が消失 (サイレンシング) していくラインが得られ、G3Sm2 と名付けた (図 4)。G3Sm2 は発芽後 2 週間では強い蛍光を発していたが、第 1 本葉の主葉脈にそって蛍光が減少していた。生長につれて蛍光の消失は進んでゆくが、その程度は大きく 2 つに分類することができた。消失の程度が弱い個体 (weak phenotype) では、蛍光の消失は太い葉脈沿いにとどまり、葉が完全展開した後でも葉脈間の GFP 蛍光は残っていた (図 4G)。消失の程度が強い植物個体 (strong phenotype) では、発芽後 4~5 週間でほぼ全身の蛍光が消失した (図 4F)。ただし茎頂では弱い蛍光が認められた。strong phenotype の個体から得た自殖後代を選抜し、表現型が安定した系統 (G3Sm2-1、以降はこの系統を G3Sm2 と呼ぶことにする) の個体を以降の実験には用いた。また、GFP を恒常的に発現するライン G3Sm1 を選抜し、コントロールとして用いた (図 4A~C)。

G3Sm1、G3Sm2 とともに外見的には全く正常に生長した。サザンブロット解析から、G3Sm1 は GFP 遺伝子を 1 コピー、G3Sm2 は少なくとも 3 コピーもつことが分かった (図 5A)。GFP mRNA 量は GFP 蛍光の消失した G3Sm2 では G3Sm1 より少なかった (図 5B)。GFP も G3Sm2 ではほとんど検出できないレベルであった (図 5C)。さらに、G3Sm2 特異的に、GFP 配列をもつ siRNA が検出された。siRNA は約 21~23 nt のものと約 25 nt の 2 つのクラスが存在が認められた (図 5D)。この結果は PTGS を起こしている植物に見られる現象と一致する (Hamilton and Baulcombe, 1999; Hamilton et al., 2002)。G3Sm2 タバコは GFP 遺伝子配列をもつ ToMV および PVX に対して抵抗性を示したが、RFP 遺伝子配列をもつ ToMV や GUS 遺伝子を発現する PVX に対しては感受性であった (図 6、図 12B)。これは G3Sm2 に GFP 遺伝子配列をもつ RNA を特異的に分解する活性があることを示している。

以上の結果から、G3Sm2 においては GFP の発現が PTGS により抑制されていると結論

した。

ToMV 感染における病徴とサイレンシングの抑制

ToMV はタバコにモザイク病を引き起こす。ToMV による病徴の発現と PTGS 抑制能の関係を明らかにするため、G3Sm2 に ToMV を接種し、病徴と GFP 蛍光を観察した。G3Sm2 の ToMV による病徴は、外見的に非形質転換タバコのものと同じであった。

G3Sm2 のモザイク症状を呈した葉（モザイク葉）では、青色光の照射により非常に強い緑色蛍光が認められた（図 7A）。蛍光顕微鏡による観察で小胞体のネットワークで蛍光が見られることや、紫外線励起では蛍光が見られないことから、この蛍光は *erG3GFP* に由来するものと考えられた。蛍光を発する部位からはウエスタンブロットとノーザンブロットにより GFP と GFP mRNA が検出された（図 8C、図 10A）。また、非形質転換植物に ToMV を接種した場合はこのような蛍光は認められず、G3Sm1 タバコではどの葉においても GFP 蛍光の目立つた変化は認められなかった（結果省略、図 19B を参照）。したがって、ToMV が（おそらくゲノムにコードされた PTGS サプレッサーの働きにより）GFP に対する PTGS を抑制したことが強く示唆された。

次に、ToMV による病徴と PTGS の関連をより詳しく解析することにした。TMV によるタバコモザイク病を詳細に記述した Atkinson and Matthews (1970)の研究に従い、長さが 7.5~9 cm になった時点の第 5 本葉に、ToMV を 10 μ g/ml の濃度（Xanthi nc タバコに約 100 個の局部壊死斑を形成する濃度）で接種した。この接種条件では各葉の病徴は再現的に現れる。接種時の G3Sm2 の蛍光は茎頂をのぞいて完全に消失している。Atkinson and Matthews (1970)に従い接種葉（第 5 本葉）を L0 と呼び、その上の葉を順に L1, L2, , ,と呼ぶことにする。

L0~L2 には目立つ病徴は生じず、GFP 蛍光は消失したままだった。

接種後 3~4 日の L3 と L4 では、クラス I~IV の葉脈に沿って GFP 蛍光が認められた（図 7C）。これらの葉では接種時には蛍光が消失していたため、一度起きた PTGS が解除されたものと思われる。クラス III~IV の葉脈には葉脈透化と呼ばれる、葉脈が透き通って浮き上がったように見える症状が現れ、GFP 蛍光の分布とよく一致していた。

L4 より上の葉では、モザイク症状の模様ときれいに一致した形で強い GFP 蛍光が見られた。モザイク葉において葉の濃い緑色の部分は dark green tissue (DGT)と呼ばれ、薄い緑色の部分は yellow tissue (YT)と呼ばれる（第 2 章序論）。蛍光は、DGT ではほとんど見ら

れず、YT でのみ見られた(図 7B)。しかしながら、大きな DGT の内部には不規則な形をした黄色い領域が存在し、そこでは弱い蛍光が見られた(第2章で述べる)。ひとたび GFP に対するサイレンシングが解除されると、その状態は葉が完全に老化するまで持続した。

TomMV 複製酵素の変異による無病徴化と PTGS 抑制能の欠損

GFP に対する PTGS の抑制(すなわち TomMV の PTGS サプレッサー活性)が病徴と深く関連したことから、病徴を生じない TomMV 弱毒株ではサプレッサー能はどうなっているのかという疑問が生じた。TomMV 弱毒株である L₁₁ 株と L₁₁A 株は、タバコに全身感染するにも関わらずモザイク症状を引き起こさない。L₁₁ と L₁₁A を G3Sm2 に接種したところ病徴はほとんど生じず、また GFP 蛍光を復活させることができなかった(結果省略、図 8)。

L₁₁A は野生型株と比較して 10 ヶ所に塩基置換変異をもち、うち 3 ヶ所は複製酵素である 130K タンパクにアミノ酸置換変異をもたらす(Nishiguchi et al., 1985; Meshi et al., 1986)。そのうちの最初の変異(1117 nt)は L₁₁ と L₁₁A に共通することから、この変異が弱毒化と PTGS 抑制能欠損の原因であると考えられた。しかし、L₁₁ のゲノムは部分的にしかシーケンスされていなかったため、ほかの変異が原因であることも考えられた。そこで、1117 nt の変異が原因であることを確認するために一連の組換えウイルスを作製し、それらの PTGS 抑制能を調べた。

TLJA1 (pTLJA1 の試験管内転写産物)は TLW3 (野生型株 TomMV-L と同等)と比較して 4 ヶ所の塩基置換をもち、3 ヶ所のアミノ酸置換変異をすべてもつ(図 8A)。TLJA1 は Samsun タバコにはモザイク症状を引き起こさず、Xanthi nc には正常な局部壊死斑を形成するなど、L₁₁A と同じ性質を示した。さらに、G3Sm2 の GFP に対するサイレンシングを抑制することもできなかった。したがって PTGS 抑制能欠損の原因はこの 4 つの変異のどれかであると予想された。どの変異が原因なのか明らかにするため、これらの変異を部分的にもつ 2 種類の組換えウイルスを作製した。

TLJ は TLJA1 の変異のうち 1117 nt の変異(これ以降、J 変異と呼ぶことにする)だけをもち、TLA は残りの 3 つの変異(まとめて A 変異と呼ぶことにする)をもつ。TLJ もモザイク症状を示さず、かつ抑制能を欠損していた。一方、TLA は弱いながらもモザイク症状を示し、かつ抑制能を保持していた(図 8B)。したがって、弱毒性と抑制能欠損には J 変異のみで十分であることが分かった。

TLJ と TLJA1 が本当に全身感染していながら GFP のサイレンシングを抑制しないというを確認するために、上位葉のタンパク解析を行った (図 8C)。モザイク葉においてウイルスは YT に多く存在し、DGT にはほとんど存在しないことが知られている (Atkinson and Matthews, 1970)。これと一致して、TLW3 と TLA によるモザイクの YT には多量のウイルス CP と GFP が検出され、DGT では少量しか検出されなかった (図 8C, レーン 6, 9 と レーン 5, 8)。TLJ と TLJA1 の無病徴な感染上位葉では、CP は一定量蓄積していたものの、GFP 量は mock 接種とほとんど変化がなかった (図 8C, レーン 7, 10)。したがって、J 変異をもつ ToMV は全身感染性を有しながらも、PTGS 抑制能を欠損していることが分かった。

ただし、以下に述べる観察から、J 変異は ToMV の PTGS 抑制能を完全に失わせるものではないと考えられた。TLJ と TLJA1 を接種した G3Sm2 のモザイク葉に相当する葉 (L5 以上の葉) は病徴を示さず GFP 蛍光も復活しないが、L3 と L4 は弱い葉脈透化症状を示し、これらの葉ではかすかな GFP 蛍光も認められた。これは L_{11} および $L_{11}A$ でも同様であった。この蛍光は感染初期にのみ見られ、時間が経つと蛍光は消失してしまう。このような現象は、これらのウイルスを小さな葉 (長さ 2~3 cm) に接種した場合に、より顕著に見られた (図 8D)。TLJ または TLJA1 を接種した場合には数日後に弱い退緑斑と葉脈透化が現れ、それと一致して GFP 蛍光が復活した。しかしさらに数日たつとその蛍光は消失してしまった。TLW3 を接種した場合にも同様に蛍光が復活し、それは消失せずに持続した。したがって、ToMV は J 変異によって PTGS 抑制能を完全に失ったのではなく、一過的に抑制する能力は保持しているものと想像された。

TLJ および TLA、TLJA1 は複製酵素に変異をもつウイルスであるため、複製能力が低下している可能性が考えられた。各ウイルスを BY2 細胞のプロトプラストに感染させ、8 hpi と 20 hpi でのウイルス量をノーザンブロットで解析した (図 9)。TLJ、TLA、TLJA1 はどれも TLW3 とほとんど同じように増殖し、サブゲノム RNA の量にもごくわずかしき差が認められなかった。したがってこれらの変異は ToMV の 1 細胞レベルでの複製能力には影響しないものと考えられた。

ToMV のサプレッサーの性質(1) siRNA 生成を阻害しない

序論で述べたように、ウイルスのサプレッサーの作用機構は多種多様であることが知られている。ToMV のコードするサプレッサーの作用機構を明らかにするための実験を行な

うことにした。

siRNA の蓄積は PTGS の指標とされることから、まず最初に mock、TLJ または TLW3 を接種したタバコの上位葉 (L6~L7、モザイク葉またはそれに相当する葉) における ToMV siRNA と GFP siRNA を解析した。

TLJ の上位葉におけるウイルス RNA 量は TLW3 の約 5 分の 1 であった (図 10A)。これは L₁₁A におけるこれまでの報告 (Nishiguchi et al., 1990) と一致していた。G3Sm1 への接種実験で、L5 における GFP mRNA 量は mock、TLW3 または TLJ を接種したものの中でほとんど差が見られなかった (図 10A、レーン 4-6)。(なお、TLW3 を接種した G3Sm1 [レーン 5]では、GFP mRNA 量がやや低下しているように見える。各レーンには全 RNA 量をそろえてローディングしており、ToMV RNA を大量に含むレーン 5 では他の RNA が占める割合が低下したためと思われる。rRNA 量と見比べれば GFP mRNA 量はレーン 4-6 でほぼ同じといえる。) TLW3 を接種した G3Sm2 では GFP mRNA 量が大幅に増加しており (図 10A、レーン 8)、これはモザイク葉の YT で GFP に対する PTGS が抑制されたこと (図 7)と一致する。mock および TLJ 接種した G3Sm2 上位葉でもわずかながら GFP mRNA が検出されたものの (図 10A、レーン 7, 9)、ここでは病徴や GFP 蛍光は見られなかった。

全 RNA から低分子量 RNA を濃縮し、ノーザンブロット解析に供した (図 10B)。TLW3 または TLJ を接種したタバコでは ToMV に由来する small RNA が検出された。TLW3 と TLJ でバンドのパターンに大きな差は認められなかった。ToMV のマイナス鎖に由来する siRNA は GFP siRNA と同様 21~23 nt と 25 nt の位置にバンドが見られたが、25 nt のバンドは GFP siRNA のものより薄かった。(これは 3 回の独立な実験で再現的だった。) ToMV のプラス鎖に由来する siRNA は 21~24 nt の位置にバンドが見られ、さらに 25 nt 以上にスミアバンドが現れた。GFP siRNA は G3Sm2 特異的に検出され、G3Sm1 では ToMV 感染の有無に関わらず検出されなかった (図 10B)。

これらの結果は ToMV に由来する siRNA が ToMV 感染後に生産されたことを示しているが、上位葉における ToMV siRNA 生産のタイムコースや空間的分布を詳しく知ることはできない。なぜなら、ウイルスが上位葉にいつ侵入し、葉のどの程度の領域まで感染したのか分からないからである。そこで G3Sm2 の接種葉 (L0) で、接種後 2、4、6、8 日後に siRNA 解析を行うことにした (図 10C, D)。TLW3 接種葉では TLW3 は接種 8 日後まで増殖し続けた。一方 TLJ は 4 日後でほぼ増殖が停止した。この結果も L₁₁A で報告された増殖パターンと一致した (Nishiguchi et al, 1990)。L0 では GFP 蛍光が復活しないことと

一致して、GFP mRNA 量の顕著な増加も見られなかった (図 10C)。

TLW3 に由来する siRNA は 2 dpi から検出され、ウイルスが増殖するにつれて急激に増加した (図 10D)。siRNA 蓄積のタイムコースは TLJ においてもほぼ同様であった (図 10D)。したがって、ゲノム RNA に対するウイルス siRNA 量の比を比較するならば、TLJ 接種葉の方が高く、それは時間が経つほど顕著になった (図 10C, D) (この理由は考察の項で述べる)。GFP siRNA の量は TLW3 および TLJ 感染でも影響を受けなかった (図 10D)。

ウイルスに由来する siRNA が感染初期から生産されたことや、TLW3 と TLJ の感染葉の間で ToMV siRNA および GFP siRNA 量がほぼ等しかったことから、ToMV のコードするサプレッサーは siRNA 生成のステップを直接的には阻害しないことが示唆された。

ToMV のサプレッサーの性質(2) 新規 RISC 形成の阻害

TLW3 を接種した G3Sm2 の接種葉では GFP に対するサイレンシングは抑制されなかった。この結果は ToMV のサプレッサーが、GFP mRNA に対する既存の RISC を阻害しないことを示唆する。一方で ToMV RNA 量が増加し続けたということは、サプレッサーは ToMV RNA に対する RISC が新しく形成されるのを阻害すると解釈できる。しかし、G3Sm2 のうち蛍光消失の弱い植物体 (前述、図 4G) では、葉がある程度展開してしまうと PTGS がそれ以上進まなくなることを見ると、前実験の接種葉 (L0) がもはや新規に PTGS が起こらない状態である可能性も考えられる。そこで、L0 の細胞がまだ ToMV に対する PTGS を新たに成立させることができるか否か、また ToMV のサプレッサーがその PTGS を阻害できるか否かを調べることにした。

この目的のために、図 11A に示す 2 つの組換え ToMV を作製した。TLBN.G3 と TLBN.G3(J)は重複した CP サブゲノム RNA プロモーターの間に G3GFP ORF をもち、GFP を発現する。TLBN.G3 は野生型の 130K 遺伝子をもつ。TLBN.G3(J)は 130K 遺伝子に PTGS 抑制能の欠損に関与する J 変異をもたせたウイルスである。もし L0 で ToMV 感染に伴って PTGS が誘導され、かつ複製酵素が PTGS の抑制に関わっているならば、TLBN.G3(J) に由来する GFP 蛍光は弱くなることが予想される。

図 11B に 6 dpi での感染部位の GFP 蛍光を示す。非形質転換体および G3Sm1 の両方において、TLBN.G3 感染部位では円盤状の、TLBN.G3(J)感染部位ではリング状の GFP 蛍光が見られた。TLBN.G3(J)が形成したリング状の感染部位の中心では接種 3~4 日後から GFP 蛍光の低下が見られ始め、徐々に拡大した。G3Sm1 上の感染部位では、リング中心部の

GFP 蛍光はリングの外側（非感染部位）よりも蛍光が暗かった。このことは、ウイルスに対して PTGS が起動され、G3Sm1 のトランスジーンに由来する GFP の発現も PTGS により同時に抑えられていると考えることで説明できる。

そこで、本当にトランスジーン由来の GFP mRNA レベルが低下しているかどうか RT-PCR により調査した。感染部位の内部と非感染部位からそれぞれ全 RNA を回収し、cDNA を合成した。トランスジーン由来の GFP mRNA 配列および ToMV の配列を特異的に PCR で増幅した（図 11C）。コントロールとしてアクチン mRNA 配列を増幅した。ウイルスに由来する PCR 産物は感染部位のサンプルだけで検出された（図 11C、レーン 3, 5, 7, 9）。GFP mRNA に由来する PCR 産物は TLBN.G3(J)の感染部位では非感染部位と比較して少量しか増幅されなかったが（図 11C、レーン 7, 9）、TLBN.G3 の感染部位では非感染部位および mock 接種と同じように増幅した（図 11C、レーン 3, 5）。この結果から、L0 の細胞では ToMV ゲノムを標的とした PTGS が成立する（すなわち新規の RISC が形成される）ことが示され、さらに TLBN.G3 のコードするサプレッサーが新規の RISC 形成を阻害することが示唆された。また、ToMV 複製酵素の J 変異によってこの阻害効果が弱まったことから、複製酵素が PTGS 抑制のプロセスに関与していることが強く示唆された。

ToMV のサプレッサーの性質(3) 一旦成立した PTGS を阻害しない

ToMV を接種した G3Sm2 の接種葉（L0）では GFP 蛍光は復活せず、GFP mRNA 量も増加しなかった（前述、図 10C）。このことから、L0 における一度成立した（GFP に対する）PTGS は、ToMV 感染によって阻害を受けないことが示唆された。だが、G3Sm2 の L0 で ToMV が感染しても GFP が発現してこない原因が、GFP の発現が PTGS 以外の理由で抑制されているという可能性も否定できなかった。（たとえば、GFP の発現が抑制されている原因が、最初は PTGS であったが接種時期には transcriptional gene silencing に変わっているような場合には、ToMV がどんなに強い PTGS 抑制能をもっていたとしても GFP は発現してこないだろう。）ToMV のサプレッサーが既存の RISC を阻害できないことをよりはっきりさせるため、GFP 配列をもつ PVX に対する G3Sm2 の抵抗性が、ToMV 感染で影響を受けるかを調べることにした。

実験手順を図 12A に示す。まず G3Sm2 に mock または ToMV を高濃度（Xanthi nc タバコに約 500 個の局部壊死斑を形成する濃度）で接種した。4 日後、ToMV が接種葉のほぼ全域に感染した時期に PVX-GFP と PVX-GUS（それぞれ erG3GFP と GUS を発現する組

換え PVX) を混合接種し、3 日後に GFP 蛍光の観察と GUS 染色を行った (図 12B)。非形質転換タバコではどちらの PVX も mock 接種葉と ToMV 接種葉両方で感染した。G3Sm2 では、PVX-GUS は mock 接種葉と ToMV 接種葉いずれにも感染していたが、PVX-GFP はどちらにも感染することができなかった。したがって ToMV のサプレッサーは、G3Sm2 でいちど成立した PTGS 活性 (すなわち既存 RISC の活性) には全く (あるいは無視できるレベルでしか) 影響を与えないものと判断した。

ToMV のサプレッサーの性質(4) ToMV の 130K タンパクは単独で PTGS を抑制する

ToMV の複製酵素のアミノ酸置換変異により ToMV の PTGS 抑制能が失われること (図 8、図 10、図 11) から、130K タンパクそれ自体がサプレッサーである可能性が高いと考えられた。これを確認するため *N. benthamiana* を用いたアグロインフィルトレーション実験を行なった。この実験は 35S プロモーター下流につないだ GFP 遺伝子 (35S/GFP) をもつアグロバクテリウムの懸濁液を *N. benthamiana* の葉に注入すると、GFP の発現は PTGS により数日以内に抑制されるが、サプレッサー遺伝子を同時に導入した場合には PTGS が抑制されて GFP の発現が持続するというものである (図 13A、Voinnet, 2001; Johansen and Carrington, 2001)。

GFP 形質転換 *N. benthamiana* である G3Nb3 の葉に 35S/GFP をアグロインフィルトレーションで導入すると、注入後約 2 日から GFP 蛍光は減少した (図 13B)。図は注入後 22°C において 5 日後の蛍光像である。ToMV の 130K 遺伝子、あるいは既知のサプレッサーである PVY の HC-Pro 遺伝子のコンストラクトを 35S/GFP とともに導入した場合には GFP 蛍光が持続したことから、PTGS が抑制されていることが分かった (図 13B)。130K 遺伝子にフレームシフト変異を導入した 130K(FS)を導入しても GFP の発現は持続しなかった (図 13B)。アグロバクテリウム懸濁液の注入部位で 130K タンパクが発現していることをウエスタンブロットにより確認した (図 14A)。また、130K タンパクを単独で G3Nb3 に発現させても、GFP の発現が上昇することはなかった (結果省略)。したがって、ToMV 130K タンパクは単独で PTGS サプレッサーとして機能することが示された。

図 13B の条件下 (22°C、5 日) で、J 変異をもつ 130K (130K(J)と呼ぶことにする) は、野生型よりもやや弱かったがサプレッサー活性を保持していた (結果省略)。しかし、J 変異の効果が温度依存性である可能性があること (TLBN.G3(J)は低温条件では円盤状の感染部位を形成し、PTGS を抑制したように見えた。結果省略) や、PTGS 活性は高温の

方が高いこと (Szitty et al., 2003) から、130K(J)が高温条件 (28°C) でもサプレッサー活性を有するかを調べた。図 13C に示すように、28°Cでも 130K(J)は GFP に対する PTGS を抑制したが、GFP 蛍光は 130K よりも弱かった。ウエスタンブロット解析により GFP 量を比較しても、130K(J)の方が少ない蓄積を示した (図 14B、レーン 4, 5) ことから、130K(J)のサプレッサー活性は野生型よりも弱いと考えられた。注入部位における GFP mRNA 量は GFP 蛍光の強さや GFP 量を反映するものであり、130K と 130K(J)を発現する組織は 130K(FS)よりも多量の GFP mRNA を蓄積していた (図 14C)。130K タンパクを発現する組織でも GFP siRNA が蓄積していたことは (図 14D)、130K が PTGS 経路のうち siRNA 生成よりも下流のステップを阻害するとのアイデア (前述) と一致する。コントロールとして用いた PVX の p25 が長いクラス (約 25 nt) の siRNA の蓄積を阻害し、TSWV の NSs が長いクラスと短いクラス (約 21~23 nt) 両方の siRNA 生成を阻害していたことはこれまでの報告と一致していた (図 14D) (Hamilton et al., 2002; Takeda et al., 2002; Bucher et al., 2003)。

130K タンパクのサプレッサー活性は GFP 蛍光の強さや GFP mRNA 量から判断して HC-Pro より弱いと考えられたが (図 13C, 14C)、これは *N. benthamiana* を用いたせいかもしれない。TLBN.G3 を *N. benthamiana* (非形質転換体または G3Nb3) に接種すると、タバコに接種したときよりも感染部位がリング状になる傾向がみられたことから (結果省略)、ToMV のサプレッサー活性は *N. benthamiana* では十分に発揮されない可能性も考えられた。

130K のリードスルー産物である 180K タンパクのサプレッサー活性はアグロインフィルトレーションで検出できたが 130K タンパクよりも弱かった (図 13D)。TMV の複製酵素である p126 もサプレッサー活性を示した (図 13D)。

1.4 考察

本研究では PTGS を起こす GFP 形質転換タバコ (G3Sm2) を用いて、ToMV がコードする PTGS サプレッサーとその性質について解析した。野生型 ToMV (ToMV-L と TLW3) は G3Sm2 に目に見える病徴を生じさせ、それと一致して GFP のサイレンシングを抑制した (図 7)。L 株に由来する弱毒株である L₁₁ と L₁₁A は病徴を引き起こさず、サイレンシングの抑制も起こらなかった。これらの弱毒株の抑制能欠損の原因となる変異は複製酵素の 1 アミノ酸置換であった (図 8)。アグロインフィルトレーションにより、130K タンパクは単独で PTGS を抑制する能力をもつことを明らかにした (図 13、図 14)。

ToMV 130K による PTGS 抑制

PTGS を起こした植物には siRNA が蓄積する (Hamilton and Baulcombe, 1999; Hamilton et al., 2002)。動物と同様に植物でも 21 nt の短いクラスの siRNA は RISC に取り込まれて、分解すべき RNA の認識に関与すると考えられている (Hamilton et al., 2002; Voinnet, 2002)。ToMV 感染葉ではこのクラスの siRNA がプラス鎖とマイナス鎖ともに存在しており、その量はウイルスの増殖に伴って増加した (図 10)。また、TLBN.G3(J)を接種した G3Sm1 の感染部位で GFP mRNA 量が低下した (図 11)。これらの結果から、ToMV 感染細胞内では ToMV RNA に対する PTGS が起動されると考えられた。

序論でも触れたようにこれまでに多くのウイルスについてサプレッサーが同定され、その機能解析が行なわれている。しかし、生化学的解析により分子レベルで作用機構が解明されたのは現在のところ *Tombusvirus* の p19 だけであり、p19 は siRNA に結合することでその機能を阻害する。他のサプレッサーについて標的分子や分子レベルでの作用機構が完全に解明されたわけではないが、アグロインフィルトレーションアッセイの結果などから作用機構の推測がなされている。

アグロインフィルトレーションアッセイにおいて TCV のサプレッサーである CP や *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) のサプレッサーである NSs は、GFP siRNA の蓄積をほぼ完全に消失させることから、PTGS 反応系のかなり上流のステップ (dsRNA 生成や Dicer 活性) を阻害すると予想されている (Qu et al., 2003; Bucher et al., 2003) (図 14D)。ToMV の 130K タンパクの場合、GFP siRNA 量はコントロールと比較してやや少ないものの蓄積はしており、また野生型 130K と 130K(J)での GFP siRNA 量にも違いが見られなかった (図

14D)。このことは 130K タンパクが PTGS 反応系において siRNA 生成よりも下流のステップを阻害していることを示唆している。

PVX のサプレッサーである p25 は PTGS シグナルの生成を阻害するが、ウイルスが複製している部位で誘導される局所的な PTGS は抑制できないことが示されている(Voinnet et al., 2000)。ToMV の場合は図 11 に示すように、TLBN.G3(J)は感染によって誘導された PTGS の標的となって分解された一方、TLBN.G3 はこの PTGS を抑制していた。この結果から ToMV のサプレッサーである 130K は、PVX の p25 とは異なりウイルス複製に由来する局所的 PTGS の開始を抑制する活性をもつことが分かった。

植物では長いクラスと短いクラスの siRNA が存在し、長いクラスの siRNA の蓄積は全身性シグナルの生成と相関がみられる(Hamilton et al., 2002)。PVX の p25 はシグナルの生成を阻害し、それと一致して長いクラスの siRNA の蓄積を阻害する(Voinnet et al., 2000; Hamilton et al., 2002) (図 14D)。ToMV の 130K タンパクにはそのような活性は認められないにも関わらず (図 14D)、ToMV 感染葉では長いクラスの ToMV siRNA 量が少なかった (図 10、GFP siRNA と比較)。一つの可能性は、ToMV が 130K 以外にもサプレッサーをコードしていて、長いクラスの siRNA の生成を積極的に阻害していることが考えられる。もう一つの可能性として、ToMV の感染によって siRNA が生成される経路とトランスジェーンから siRNA が生成される経路が異なることが考えられる。シロイヌナズナにおいて、ssRNA から siRNA プライマーに依存せず、RdRP である SDE1 により生産された dsRNA からは、短いクラスの siRNA だけが生成される(Himber et al., 2003)。一般に RNA ウイルスに由来する siRNA は複製中間体として存在する dsRNA が切断されて作られると考えられているが、ToMV siRNA のもととなった dsRNA はウイルス複製中間体なのではなく、1 本鎖ゲノムやサブゲノム RNA が宿主 RdRP によって転換されて生じた dsRNA が大部分なのかもしれない。実際、RNA ウイルスは膜に囲まれた構造体 (複製複合体) の中で複製すると考えられており、複製中間体が細胞質の Dicer によって直接切断を受ける可能性は低いと思われる(Ahlquist, 2002)。いずれにせよ、長いクラスの ToMV siRNA 量が少ないことは、ToMV に対する PTGS のシグナルが全身に広がるのを妨げ、感染を成立しやすくしているのかもしれない。

G3Sm2 の PVX-GFP に対する抵抗性は、ToMV 感染によって打破されなかった (図 12)。このことは ToMV は一度成立した PTGS を抑制することができないことを示すと同時に、サプレッサーである 130K タンパクが既存の RISC の活性を阻害しないことを示唆してい

る。

以上の結果を総合して、130K タンパクが PTGS 反応系において阻害するステップは、siRNA 生成より下流で、RISC による ssRNA 切断よりは上流の、siRNA を利用して新規に RISC を形成するステップであると予想した (図 15)。また、siRNA が完全にはなくならないが減少することから (図 14D)、siRNA を利用して dsRNA を再生産する経路を阻害し、間接的に siRNA 生成を阻害しているかもしれない (図 15、点線)。

130K のリードスルー産物である 180K タンパクにも、弱いながらサプレッサー活性は検出された (図 13D)。しかし、実際のウイルス感染において 180K は 130K の 10 分の 1 程度しか発現しないことから、PTGS の抑制に貢献する度合いはかなり低いものと推察される。*Tobamovirus* の 130K と 180K は 1 対 1 の割合で結合して複製酵素複合体を形成すると考えられており (Watanabe et al., 1999)、これが正しければ感染細胞内には複製に関与しない 130K が過剰に蓄積することになる。Hagiwara ら (2003) は ToMV 感染細胞の密度勾配遠心を用いた分画を行い、130K と 180K は液胞膜画分、小胞体膜と思われる画分および細胞質画分に存在するが、ウイルス合成活性は液胞膜画分および小胞体膜画分のみ存在し、細胞質画分にはほとんどないことを示した。これらの知見に基づけば、130K のうち細胞質にあって複製に関与していないものが PTGS の抑制に寄与しているとの仮説がたてられる。プロトプラスト感染において、J 変異をもつ TLJ、TLJA1 は TLW3 と比較して複製能力に差は認められなかったが (図 9)、130K タンパクは約 3 分の 1 しか蓄積していなかった (結果省略)。また、アグロインフィルトレーションした組織で 130K(J) の蓄積量は 130K より少なかった (図 14)。TLJ と TLJA1 は、J 変異によって 130K のうち細胞質画分に存在するものの蓄積量が減少した結果、PTGS 抑制能が低下したのかもしれない (萩原優香博士の観察結果)。興味深いことに、TMV の PTGS サプレッサーである p126 と GFP の融合タンパクは細胞質内に凝集体 (cytoplasmic body) を形成し、その大きさと PTGS 抑制能の強さには相関があることが報告されている (Ding et al., 2004)。

ToMV による病徴と PTGS 抑制

野生型 ToMV は G3Sm2 において病徴と一致したパターンで PTGS を抑制した。すなわち、L0~L2 葉には目立つ病徴と GFP 蛍光は生じず、葉脈透化症状を示した L3、L4 葉には葉脈に沿って GFP 蛍光が復活し、L4 より上のモザイク葉ではモザイクの模様と完全に一致して YT にのみ GFP 蛍光が見られた (図 7)。

ウイルスを接種した時点で L0~L2 の葉では GFP の蛍光は消失しており、PTGS は確立していた。このような葉では GFP RNA を分解する RISC が多く存在しており、130K タンパクは既存の RISC 活性を阻害できないために GFP に対する PTGS が抑制できないのであろう (図 10)。

葉脈透化を示した L3、L4 葉もウイルス接種時には GFP 蛍光が消失しており、PTGS は既におきていたにもかかわらず、ToMV は GFP 蛍光を復活させることができた。これは 130K タンパクが既存の RISC をある程度は阻害できるためかもしれない。あるいは、L3、L4 のような若い葉では RISC の代謝回転が速く、新規の RISC 形成を阻害するだけでも PTGS の抑制が可能なのかもしれない。G3Sm2 の小さな葉に接種すると TLJ でも一時的に PTGS を抑制したことから (図 8)、この活性は 130K タンパクに由来するものではない (たとえば激しいウイルス増殖による細胞内の生理状態の混乱) ことも考えられる。

モザイクはウイルスを接種した時点では非常に小さかった葉に生じる。このような葉での PTGS の抑制は新規 RISC 形成の阻害だけでも説明が可能である。葉が小さいときに ToMV が感染して、新しい RISC が形成されなくなれば、その後の細胞分裂に伴って既存の RISC は希釈される一方なので、PTGS は起きなくなるであろう。モザイク葉で DGT と YT の分布が GFP 蛍光の分布と非常によく一致していた。このことは PTGS (とその抑制) がモザイクパターンの形成にも関与していることを示唆し、非常に興味深い。この点は第 2 章で詳しく述べる。

PTGS 抑制能と病原性の関係

本研究では G3Sm2 を用いた GFP 蛍光の復活を指標にして、ToMV 弱毒株の L₁₁A と L₁₁ が PTGS 抑制能を欠損したウイルスであることを見いだした。弱毒性と PTGS 抑制能欠損の原因が 130K タンパクの 1 アミノ酸置換 (J 変異) であることを明らかにした (図 8)。ToMV が複製している細胞ではウイルスを標的とする PTGS が起動され、J 変異をもつ 130K はその PTGS を抑制する能力が低下していた (図 11)。アグロインフィルトレーションアッセイから、130K のサプレッサー能は J 変異によって完全に欠損するわけではないことも分かった (図 13, 14)。

L₁₁ と L₁₁A は接種葉において、接種後数日以内に増殖がほぼ停止する現象が知られ、オートレギュレーションと呼ばれている (Kiho and Nishiguchi, 1984; Nishiguchi et al., 1990)。また、全身感染はするがウイルス量は L の約 5 分の 1 である。これらの特徴は J 変異をもつ

TLJにも共通していた(図10)。このような性質はJ変異によってToMVを標的とするPTGSを抑制する能力が低下し、ウイルスRNAが切断されるからだと考えられる。図11で示したように、TLBN.G3が円盤状のGFP蛍光スポットを形成したのに対してTLBN.G3(J)がリング状のスポットを形成したことは、この考えとよく一致する。

TLW3、TLJ、TLAおよびTLJA1を比較すると、PTGS抑制能の強いウイルスほど激しい病徴を引き起こすという相関関係が見られた(図8)。Dingら(2004)もTMVの弱毒株とその変異体の解析からTMVのPTGSサプレッサーが複製酵素p126であることを示し、そのなかでウイルスの病原性とPTGS抑制能の強さに正の相関があることを報告している。また、前項で述べたように野生型ToMVを接種したG3Sm2の個体においても、病徴とPTGS抑制に相関が見られた。植物ウイルスの病原性にPTGSサプレッサーが関わる例は多数報告されており、*Tobamovirus*の複製酵素によるPTGS抑制能も病徴発現に何らかの役割を果たしていると考えられる。近年、siRNAに類似したmicroRNA(miRNA)がmRNAの切断や翻訳阻害による遺伝子の発現抑制を介して、形態形成をはじめとする様々なプロセスに重要な役割を担っていることが明らかになった(Dugas and Bartel, 2004)。miRNAはDicerによって生成されることやRISC様複合体にとりこまれてmRNAの切断を行うなど、miRNA経路とPTGS経路には共通する点が多い。miRNA経路はウイルスのPTGSサプレッサーによっても影響を受ける。種々のPTGSサプレッサーを強制発現させたシロイヌナズナでは、miRNAを介したmRNAの切断が阻害されて花や葉の形態異常が起こることから、ウイルスによる病徴の一部はサプレッサーがmiRNA経路を阻害した結果生じる形態異常であるとの説が提唱されている(Kasschau et al., 2003; Dunoyer et al., 2004; Chapman et al., 2004)。したがってToMVが引き起こす病徴も130KがmiRNA経路を阻害したことによって生じ、L₁₁Aなどの弱毒株はJ変異によってmiRNA経路を阻害できなくなったために病原性を失ったのかもしれない。ToMVによる病徴形成のメカニズムを明らかにするためには、130KのmiRNA経路に及ぼす阻害効果を解析することも必要である。

ToMVの病原性とPTGS抑制能の強さが常に相関するわけではないことを補足しておく。TMVの1系統であるV36は野生型株のU1と比較して複製酵素p126に1アミノ酸置換を有し、ほぼ無病徴である(Lewandowski and Dawson, 1993)。V36をG3Sm2に接種しても病徴は出さなかったが、弱いGFP蛍光の復活が認められ、これはV36と同じ変異を導入したToMVでも同様であった(結果省略、平井克之氏の観察)。V36の変異をもつ複製酵素はmiRNA経路は阻害せず、PTGS経路だけを抑制する可能性が考えられる。

ToMV-L₁₁A はトマト栽培において、強毒株感染による発病を防ぐクロスプロテクション効果のために長年利用されてきたが (Oshima, 1981)、そのメカニズムはまだ十分に解明されていない。序論で触れたように (少なくとも一部の) クロスプロテクションには PTGS が関与していることと、L₁₁A が PTGS 抑制能を欠損していることを考え合わせると、L₁₁A のクロスプロテクションの原因も PTGS であると予想される。この点を第 3 章で論じることにする。

第2章 *Tobamovirus* によるモザイク病のパターン形成における PTGS の役割

2.1 序論

植物ウイルスが引き起こすもっとも代表的な症状はモザイクである (Hull, 2002)。モザイク症状をおこした葉は緑色の濃い領域と淡い領域が入り混じったまだら模様となる。一枚のモザイク葉のなかで、緑色の濃い領域は dark green tissue (DGT) と呼ばれ、薄い領域は yellow tissue (YT) と呼ばれる。YT に完全に囲まれた小さな DGT は dark green island (DGI) と呼ばれる。モザイク病は長年にわたって研究がなされており、特に *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) とハクサイの系および TMV とタバコの系で詳しく解析されている (Reid and Matthews, 1966; Atkinson and Matthews, 1970)。モザイク病の形成過程は様々な要因により左右されるが、生育条件やウイルス接種のタイミングを一定にすればかなり再現的である。モザイク症状は、ウイルスが侵入した時点で一定の大きさ以下の葉にのみ生じる。DGT と YT の分布パターン (大きさ、数、位置など) の傾向は、ウイルスが侵入した時点の葉の大きさによって決まる。パターンは葉がごく小さい時期に決定され、葉が老化するまで変化することはない。

モザイク葉の細胞形態の電子顕微鏡観察から、YT では柵状細胞が肥大化するなどの異常が見られるのに対し、DGT の細胞形態は調べた限りでは正常であることが、TYMV をはじめいくつかのウイルスについて報告されている (Chalcroft and Matthews, 1966; Atkinson and Matthews, 1970; Honda and Matsui, 1974; Moore et al., 2001)。生化学的解析からも、DGT の細胞は健全葉の細胞と変わらないことが示唆されている。

Tymovirus、*Tobamovirus*、*Cucumovirus*、*Potyvirus* などが引き起こすモザイクにおいて、ウイルスは YT に多量に蓄積し、DGT にはごく少量しか蓄積していないことが知られている (Reid and Matthews, 1966; Atkinson and Matthews, 1970; Loebenstein et al., 1977; Suzuki et al., 1989)。このような DGT は、同じウイルスや近縁のウイルスの重複感染に対しても抵抗性を示す (Chalcroft and Matthews, 1967a, b; Atkinson and Matthews, 1970; Loebenstein et al., 1977)。Atkinson と Matthews (1970) は DGI の大きさや抵抗性に基づき、DGI の形成にはウ

ウイルス種または系統ごとに特異的な拡散性の因子が関与すると予想した。

モザイクに類似した現象としてリカバリーが挙げられるかもしれない。リカバリーは、感染初期にはウイルスが盛んに増殖し激しい病徴を示していた植物が、ある時点からほとんど無病徴でウイルスも含まない葉を展開させるようになる現象をいう。*Nepovirus* や *Caulimovirus* の感染で見られるリカバリーは、感染植物でウイルス RNA に対する PTGS が誘導された結果、塩基配列依存的なウイルス抵抗性を獲得したためであることが示されている (Ratcliff et al., 1997; Covey et al., 1997)。リカバリーで見られる抵抗性とモザイクの DGT での抵抗性が現象的に類似していることから、DGT ではウイルスに対する PTGS がおきているのではないかとの推測がなされた (Ratcliff et al., 1997; Jorgensen et al., 1998)。

TEV の CP 遺伝子を導入した形質転換植物に TEV を接種すると、リカバリーを起こした組織ではウイルス RNA とともに CP 遺伝子の mRNA まで PTGS の標的となり、分解を受けていた (Limbo et al., 1993)。このような、ウイルスが PTGS を誘導した結果おこる遺伝子発現の低下は特に virus-induced gene silencing (VIGS) と呼ばれている (Kumagai et al., 1995; Ruiz et al., 1998)。また、*Potyvirus* がコードする遺伝子を導入した *N. benthamiana* にそのウイルスを接種すると、はじめは強い病徴が生じ、その後リカバリーにより完全に無病徴の葉が生じたが、その途中で展開する葉にはモザイク様の病徴が現れた。そのような葉の DGI では導入遺伝子に対する VIGS が起きていた (Guo and García, 1997; Moore et al., 2001)。これらのことから、一般の (ウイルス配列と宿主遺伝子に相同性がない) DGT でも、ウイルス配列に対する PTGS が起きていることが示唆された。Moore ら(2001)は、移行性の PTGS シグナルが DGI 形成に必要な拡散性因子ではないかとの考えを提出している。

TMV によるモザイク葉では、DGT にウイルスがほとんど蓄積しておらず、TMV 感染にも抵抗性を示す (Atkinson and Matthews, 1970)。また、第 1 章で述べたように、ToMV が感染した G3Sm2 の DGT では、GFP に対する PTGS が抑制されていなかった。これらのことから私は、*Tobamovirus* によるモザイクの DGT でウイルスが蓄積できず重複感染に対しても抵抗性を示す原因は、DGT で TMV に対する PTGS が起動されているためと予想した。この可能性を検証するため、モザイク葉での TMV に対する PTGS の解析を行った結果、PTGS が起きている領域は DGT のごく一部であるが、この領域が DGT と YT の境界を決定する上で重要な役割を担うことが強く示唆された。この結果に基づいて、モザイクのパターン形成のメカニズムについてのモデルを提出する。

2.2 材料と方法

GFP 蛍光の観察

GFP 蛍光の観察は第 1 章の材料と方法 (17 ページ) と同様に行なった。

植物の栽培

植物の栽培は第 1 章の材料と方法 (22 ページ) と同様に行なった。

ウイルス接種

TMV は標準的系統である TMV-OM (Nozu and Okada, 1968) を用いた。接種は第 1 章の材料と方法 (21 ページ) と同様に行った。

プラスミド

・ pTLGC30S

pbLAB (第 1 章) の *Nsi*I 部位に G3GFP 遺伝子の配列の一部をもつオリゴヌクレオチドリンカー (下、G3GFP 遺伝子に由来する配列を下線で示す) を挿入して pbLAB-GC30S を得た。pbLAB-GC30S を *Bst*EII-*Mlu*I 消化して得られる約 0.6 kb の断片を pTLW3 の *Bst*EII-*Mlu*I 部位に挿入して、pTLGC30S を得た。

5' -TGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAATGCA-3'

3' -ACGTACGACGACCCTAATGTGTACCGTACCTACTT-5'

・ pbOM-NE

TMV-OM 系統のゲノム RNA を鋳型に *Eco*RIAgeI-OM6395rv および *Sac*I-OM3000fw プライマーを用いて RT-PCR を行い、*Nco*I/*Eco*RI 消化して得られた断片 (TMV ゲノムの 3' 側の約 0.94 kb に相当) を pBluescript にクローニングして pbOM-NE を作製した。

*Eco*RIAgeI-OM6395rv

5'-TTCGAATTCACCGGTGGGCCCCTACCGGGG

*Sac*I-OM3000fw

5'-CTCGAGCTCGCCGATGTCACACATTATCTG

RNA 解析

TMV を接種して約 14 日後のモザイク葉を、ディスポーザブル外科用メスを用いて true DGT、pseudo DGT および YT に切り分けた。第 1 章と同様にして全 RNA を抽出し、GFP mRNA と siRNA の解析を行った。TMV RNA および TMV siRNA をノーザンブロットで検出するための RNA プローブは、pbOM-NE を鋳型として T7 または T3 RNA polymerase による試験管内転写により作製した。

2.3 結果

TMVによるタバコモザイク病と PTGS 抑制

GFP 蛍光が消失した G3Sm2 タバコに TMV (OM 系統) を接種した。Atkinson and Matthews (1970) に従い、長さが 7.5~9 cm の第 5 本葉に接種し、病徴と GFP 蛍光を経時観察した (図 16)。ToMV を接種した場合 (第 1 章) と同様に、L0~L2 の葉には目立った病徴や GFP 蛍光は認められなかった。接種後約 3~4 日後の L3 および L4 では葉脈透化が生じ、葉脈沿いに GFP 蛍光が復活した (図 17A)。約 1 週間後にはモザイクが生じ、YT でのみ強い蛍光を発していた (図 16、図 17B)。モザイク葉の DGT と YT の分布パターンは葉がごく小さい時期に決定され、その後は変化が見られなかった (図 16)。Atkinson と Matthews (1967) は DGT を取り囲むような葉の辺縁部に細い YT がしばしば観察されることを報告しており、それと一致して、葉を縁取るように GFP 蛍光を発する領域が観察された (図 17C)。モザイク葉の主脈の横断面を観察すると、GFP 蛍光は表皮でのみ検出され、ウイルス感染領域を反映しているものと思われた (図 17D)。図 17E に示すようにモザイク葉の DGT と YT の境界ははっきりと分かれており、蛍光強度が中間的な細胞層は数細胞しか含まなかった。

TMV によるモザイクでは、初期の DGT は一様に濃い緑色をしており、TMV 粒子をほとんど含まない。しかし時間の経過とともに DGT の一部 (pseudo DGT と呼ばれる) はウイルスを蓄積し、黄色化することが知られている (Atkinson and Matthews, 1970)。一方、ウイルスをほとんど含まず、濃緑色を維持する領域は true DGT と呼ばれる。図 17F に示すように、pseudo DGT とみられる黄色化した領域では弱い GFP 蛍光が認められた。

ToMV によるモザイクでは葉の奇形は弱く、多数の小さな DGT が生じる傾向があった。一方 TMV のモザイク葉はしばしば輪郭の変形と葉面の凹凸化を呈し、少数の大きな DGT が生じるなどの点で ToMV と相違が認められた。しかし TMV 感染においても、基本的には病徴と一致した形で G3Sm2 の PTGS が抑制されることが分かった。

TMV モザイクにおけるウイルスおよび siRNA の分布

TMV のモザイク葉で起きている PTGS の状態を調べるため、接種後約 14 日のモザイク葉を true DGT、pseudo DGT、YT に切り分け、RNA 解析を行った (図 18)。YT には多量の TMV が蓄積していた (図 18A)。true DGT サンプルからは微量の TMV ゲノムが検出

されたが、これは YT が混入したためかもしれない。pseudo DGT での蓄積量は DGT と YT の中間であった。この TMV の分布パターンは NT、G3Sm1 および G3Sm2 すべてに共通であり (図 18A、省略)、Atkinson and Matthews (1970)の報告とも一致する。GFP mRNA は、G3Sm1 ではどのサンプルでもほぼ同じレベルであった。G3Sm2 では GFP 蛍光のパターンと一致して、DGT には少なく YT には多量に蓄積していた。

次に、低分子量 RNA を用いて small RNA 解析を行った。もし TMV に対する PTGS が原因で DGT のウイルス量が少ないのならば、DGT では TMV siRNA が多く検出されると予想された。しかし TMV siRNA 量は TMV ゲノム量と常に比例していた (図 18A, B)。

なお、第 1 章で述べた ToMV の場合と同様に、TMV プラス鎖に由来する small RNA は約 26 nt よりも長いバンドがスメアとして検出されたのに対して、マイナス鎖に由来するものはほとんどが約 21~26 nt であった。また、長いクラスの siRNA 量が少ないという特徴も同様であった。

GFP siRNA は G3Sm2 でのみ検出された。GFP mRNA が多量に蓄積し PTGS が解除されていると思われる YT では、他と比較して GFP siRNA 量が半分程度に減少していたが、消失してはいなかった (図 18B、レーン 8)。これは *Tobamovirus* のサプレッサーが siRNA 生成を抑制しない性質 (第 1 章) を反映していると思われる。GFP siRNA はセンス鎖とアンチセンス鎖でバンドパターンの違いは見られなかった。

DGT が pseudo DGT 化する以前の、接種後 7~10 日後のモザイク葉を DGT と YT に切り分け、RNA 解析を行った (図 18A 右、B 右)。GFP siRNA 量は YT では DGT とほぼ等量か (結果省略)、またはやや少なかった (図 18B、レーン 11)。TMV ゲノム RNA は DGT ではノーザンブロットで若干検出されたがごく少量であり、YT では多量に蓄積していた。TMV siRNA 量はゲノム RNA 量と正の相関を示した。したがって、初期の DGT においても TMV に対する強い PTGS は起きていないことが示唆された。

DGT におけるウイルスに対する PTGS

siRNA 解析の結果から、DGT で TMV に対する PTGS が本当に起きているのかという疑問が生じた。TMV に対する PTGS が起きているのか、起きているとすればどこで起きているのかを確かめるため、GFP に対する VIGS (序論) を利用して PTGS 領域を可視化する実験を行った。

TLGC30S は、ToMV の CP ORF の下流に 30 nt の GFP 遺伝子配列を正の向きに挿入し

た ToMV である (図 19A)。TLGC30S を、GFP を恒常的に発現する G3Sm1 タバコ (第 1 章、図 4) に接種した。ウイルスに対する PTGS が起きている領域では GFP に対する PTGS も誘導されて GFP 蛍光が低下すると予想した。

TLGC30S は G3Sm1 に全身感染して小さな DGI を生じた。NT タバコに接種したときも同様の症状を示した。もし TLGC30S の GFP 配列と G3Sm1 の GFP 遺伝子との相互作用によって強い PTGS が起きているなら、病徴は NT タバコよりも弱くなるはずなので、そのような強い PTGS は誘導されないものと考えられた。

G3Sm1 に野生型 ToMV (TLW3) と TLGC30S を接種し、モザイク葉の GFP 蛍光を観察した (図 19B)。TLW3 のモザイクでは GFP 蛍光の強度は一樣であったが、TLGC30S のモザイク葉の DGT の一部では、GFP 蛍光強度の低下が認められた。このような領域では TLGC30S に対する PTGS が誘導されており、GFP mRNA まで切断を受けたために GFP の発現が低下したと考えられる。蛍光強度の低下は、DGT のなかでも YT に接した境界部分で顕著であった (図 19B)。

true DGT では PTGS 状態が維持される

TMV のモザイクの DGT の中でも、pseudo DGT では感染初期にはウイルスはほとんど蓄積していないが、時間の経過とともに黄色化し、ウイルスも大量に蓄積するようになる。一方、YT に接する true DGT は濃い緑色を保ち、ウイルス蓄積量は少ないままであり、後から TMV を機械接種しても抵抗性を示す (Atkinson and Matthews, 1970)。モザイク葉の pseudo DGT 化と PTGS 抑制の関係を明らかにするため、G3Sm2 に TMV を接種して 67 日後のモザイク葉を観察した (図 20)。このような古いモザイク葉では、pseudo DGT は甚だしく黄色化し、GFP 蛍光も YT と同程度の強さを示した。これは TMV が pseudo DGT で増殖した結果、その PTGS 抑制能によって GFP の発現が復活したためと考えられる。一方、true DGT は濃緑色を保ち、YT を取り囲む帯のような形状を示した。GFP 蛍光は弱いままで、GFP に対する PTGS が持続していた。この結果から、YT と接した true DGT では TMV に対する PTGS も誘導されているためにウイルスの増殖を許さず、また TMV の接種に対しても抵抗性を示すのではないかと考えられた。

2.4 考察

モザイク葉での GFP に対する PTGS の抑制

ToMV と同様に、TMV が感染した G3Sm2 のモザイク葉では、YT で GFP の PTGS が完全に抑制されていた (図 17B、18A)。YT で GFP siRNA が消失していなかったことは (図 18B)、*Tobamovirus* の PTGS サプレッサーが siRNA の生成より下流のステップを阻害するとの考えを支持する (第 1 章、図 15)。pseudo DGT では最初は全く GFP 蛍光が認められなかったが、接種後約 2 週間から弱い蛍光が見られ、約 2 ヶ月後には YT とほぼ同じ強さの GFP 蛍光を発した。この現象は、pseudo DGT で GFP に対する PTGS が成立したあとに TMV が増殖し (後述)、サプレッサーが新規 RISC の生産を抑制したため既存 RISC が枯渇して、GFP の発現が回復したと解釈できる。true DGT では、2 ヶ月後でも GFP に対する PTGS が維持されていた。これは TMV が true DGT で増殖できなかったためと考えられる (後述)。

モザイク葉での TMV に対する PTGS

本研究では TMV siRNA 量の解析から、モザイク葉で TMV に対する PTGS が起きている領域を明らかにすることを試みた。実際にモザイク葉においてウイルスに対する PTGS が起きている領域を、siRNA 量を判断材料として調べた報告はある。*Hordeivirus* の一種である *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) が *N. benthamiana* に生じさせるモザイクでは、ウイルスは YT に多く DGI には少ないが、siRNA 量は逆に DGI に多く YT には少なかったことから、DGI ではウイルスに対する PTGS が起きていることが示唆されている (Yelina et al., 2002)。

TMV ゲノム RNA は YT で多く蓄積していたのに対し、初期の DGT と true DGT ではごく少量で、pseudo DGT はその中間であった (図 18A)。TMV siRNA 量は TMV ゲノム RNA 量と常に相関しており (図 18B)、DGT でウイルスが少ない原因が TMV に対する PTGS であるとの確証は得られなかった。また、TMV に対する PTGS が抑制されていると思われる YT (後述) で TMV siRNA が多量に検出されたこと (図 18B、レーン 4, 8, 11)、siRNA が検出限界以下の量でも PTGS の成立には十分である可能性も否定できないことなどを考慮すると、TMV siRNA 量は必ずしも TMV に対する PTGS の強さを反映するものではないと考えられた。さらに、true DGT のサンプルに TMV siRNA を多量に含む pseudo DGT

や YT のサンプルが混入している可能性を排除できず、siRNA 量をもとにモザイク葉の各領域における PTGS の強さを判断することは困難だと思われた。

したがって本研究ではウイルスに対する PTGS が起きた領域を明らかにするために、VIGS による GFP 蛍光強度の低下を指標とすることにした。TLGC30S を用いた解析から、少なくとも一部の DGT (または DGI) ではウイルスに対する PTGS が誘導されたと考えられた (図 19)。このような PTGS は YT と隣接した領域で顕著に見られ、YT に近い細胞ほど強く起きていた。また、YT と隣接した true DGT では TMV がほとんどいない状態が維持されることや重複接種に対して抵抗性を示すこと (Atkinson and Matthews, 1970)、G3Sm2 の true DGT では GFP に対する PTGS が長期間維持されたこと (図 20) などを総合すると、この領域はウイルスに対する PTGS が成立していると考えられる。

しかし、DGT の中でも pseudo DGT では TMV が増殖し (図 18A)、GFP に対する PTGS も抑制されたことから (図 17F、20)、pseudo DGT で TMV に対する PTGS が強く起きているとは考えにくい。PTGS シグナルを受け取った細胞で PTGS が確立されるためには、標的 RNA が一定量以上蓄積していることが必要である (Palauqui and Vaucheret, 1998)。この考えをモザイク葉にあてはめると、モザイク形成の初期に TMV 配列をもつ RNA (ウイルス自身、あるいは PTGS シグナル増幅の基質となりうるような RNA 断片) を全く含んでいなかった細胞では TMV に対する PTGS がうまく誘導されないと考えられる。このような細胞に後から TMV が侵入すれば増殖可能なはずである。なお、pseudo DGT は概して YT から離れた領域 (初期 DGT の中央部) に生じる傾向にあったことは示唆的である (図 17F、20)。

YT では GFP に対する PTGS が強く抑制されていたことや TMV が激しく増殖していたことから (図 17B、18A)、TMV に対する PTGS も抑制されていると考えられる。

モザイクのパターン形成機構

上記の結論は、DGT のなかでも YT に近い領域ほど TMV に対する PTGS が強く誘導されることを意味している。Moore ら (2001) は PTGS シグナルが一点 (DGI の中心) から拡散し、一定量以上のシグナルを受け取った細胞集団が DGI を形成すると予想した。これと逆に PTGS シグナルが YT から DGT に向かって拡散すると考えれば、TMV のモザイクパターン形成をうまく説明できる。

図 21 にパターン形成のモデルを示す。TMV は師部を通して上位葉に侵入する。(ここ

では TMV が主に葉の先端部から感染すると仮定する。) TMV は複製と細胞間移行を繰り返して感染領域を拡大していく。感染細胞は PTGS を誘導しようとするが、TMV のサプレッサーがそれを抑制する。このような細胞が YT となる。YT では PTGS シグナルが生産され、周囲の細胞に拡散する。ある時点で TMV の移行よりも PTGS シグナルの拡散が先行して、PTGS があらかじめ成立した細胞が生じる。このような細胞が帯状に連なって感染拡大を阻止する「障壁」を形成し、のちに true DGT となる。PTGS 維持のために必要なシグナルは true DGT 内部で再生産されるか、または YT から細胞間移行により供給される可能性が考えられる。*N. benthamiana* 葉でアグロインフィルトレーションによって PTGS を起こした部位からは、シグナルが細胞間移行により拡散して、約 1 mm (10~15 細胞) 離れた場所の細胞まで PTGS が誘導されるが (Himber et al., 2003、図 13B の矢印)、これは最終的な true DGT の幅とよく一致する (図 20)。TMV は true DGT の障壁を乗り越えて DGT 内部に侵入することはできないが、DGT 内部にはシグナルも届かないので PTGS は成立していない。この領域に維管束など別のルートを通して TMV が侵入すると増殖して、pseudo DGT となる。細川ら(1989)は蛍光抗体を用いた観察から DGT の内部には TMV が検出される細胞集団が存在し、その部位の中央部には小さな維管束が認められることから、葉の生長が進んだ後にこの維管束を経由して侵入してきたウイルスが増殖したのではないかと推測している。

モザイクの形成を左右するその他の因子

もちろん、モザイクのパターン形成は PTGS だけで説明できるものでは決していない。モザイクはウイルスが侵入した時点で一定の大きさ以下の葉にのみ生じることや、侵入した時点の葉の大きさによってモザイクパターンが左右されることから、モザイクの形成は葉の形態形成と密接に関連した現象であるといえる。

まず、葉の大きさが違うことにより維管束系の発達程度がことなり、これはウイルスが維管束系から放出されるタイミングや場所が各葉で異なることを意味する。さらに葉が発達することによって原形質連絡の性質も変化することから、ウイルスの細胞間移行の速度や PTGS シグナルの拡散の度合いも異なるであろう。このような違いはモザイク形成前のウイルス分布と、true DGT のできるタイミングを左右し、最終的に YT の分布に影響を与えと考えられる。また、葉の生長そのものの影響も考慮しなければならない。Atkinson と Matthews (1970)は、TMV を接種したタバコの L3 および L4 はウイルスが侵入してから

モザイク葉が完全展開するまでに、平均して 7 回の細胞分裂がおこると報告している。葉のなかで活発に細胞分裂する領域とそうでない領域のちがいが、当然モザイクのパターン形成に影響を及ぼすであろう。

同じ *Tobamovirus* でも TMV と ToMV ではモザイクパターンは明らかに異なり（図 7 と図 16 を比較）、これは両者の複製能、細胞間移行や長距離移行の能力、PTGS 抑制能などの微妙な違いを反映していると思われる。また、第 1 章で述べたようにサプレッサーが miRNA 経路へ及ぼすの阻害効果も影響しているかもしれない。

したがって、モザイク形成を理解するためにはウイルス側因子と、宿主側の因子について詳細な情報が必要である。さらに解析を進め、両者の相互作用を総合的に理解してはじめて、モザイクの形成機構が解明されるだろう。

第3章 *Tobamovirus* 感染におけるクロスプロテクション のメカニズム

3.1 序論

クロスプロテクション（干渉効果、交叉防衛）とは、あるウイルス（1 次ウイルス）が感染した植物は、それと同種または近縁のウイルス（2 次ウイルス）の感染に起因する発症を免れる現象である（次頁補足を参照）。McKinney（1929）は、緑色モザイクを生じる系統の TMV が感染したタバコには、黄色モザイク系統の TMV を接種しても黄色モザイクは生じないことを観察し、これがクロスプロテクションの最初の報告とされている。それ以来、クロスプロテクションのメカニズムについて多くの説が提唱されたが、決定的な理論は得られていない（Matthews, 1991; Fraser, 1998; Pennazio et al., 2000; Hull, 2002）。

1940 年代には、1 次ウイルスの増殖により代謝産物（アミノ酸やヌクレオチド）が不足するとの説が提案されたが、その可能性は非常に低いと考えられている（Matthews, 1991）。

Bawden and Kassanis（1945）は、ウイルスの複製には特定の細胞内部位が必要であり、1 次ウイルスがその部位を占有するために 2 次ウイルスが増殖できないと考えた。複製のメカニズム自体がよくわかっていないために具体的な証明はなされていないが、クロスプロテクションが近縁種の間でのみ起こることなどをうまく説明している。

多量に蓄積した 1 次ウイルスのプラス鎖 RNA が、2 次ウイルスのマイナス鎖 RNA とアニールして、複製の鋳型として使われなくするとのモデルも提出されているが、実験的証拠はない（Palukaitis and Zaitlin, 1984）。

ウイルス CP を発現する形質転換植物がそのウイルスに対して強い抵抗性を示すこと、その場合でもウイルス粒子でなく RNA を接種すると抵抗性が弱いことから、細胞内に蓄積した CP がウイルスの脱外被を阻害すると考えられている（Powel-Abel et al., 1986; Register and Beachy, 1988）。クロスプロテクションでも 1 次ウイルス感染細胞に蓄積した CP が、2 次ウイルスの脱外被を阻害している可能性がある（Fraser, 1998）。

Tobacco rattle virus (TRV) に GFP 遺伝子配列をもたせた TRV-GFP が感染した植物では、GFP 配列に対する PTGS が誘導され、GFP 配列を有する PVX に対して抵抗性を獲得した（Ratcliff et al., 1999）。この結果は 2 つのウイルスが近縁種でなくとも配列相同性があれ

ばクロスプロテクションが起こりうること、PTGS がクロスプロテクションの原因になりうることを示している。

クロスプロテクションのメカニズムはよくわかっていないが、農業的には弱毒株を 1 次ウイルスとして接種しておくで強毒株感染による被害を軽減できるため、ウイルス病防除の手法として実用化されている (Fulton, 1986)。この成功例として *Citrus tristeza virus* (CTV) によるカンキツトリステザ病、*Papaya ringspot virus* (PRSV) によるパパイヤ輪点病の防除などがある。日本では ToMV の弱毒株である L₁₁A 株がトマトモザイク病の防除に用いられてきた (Oshima, 1981)。

本研究では、ToMV が感染した植物において、クロスプロテクションが生じるメカニズムを解明することを目標とした。第 1 章でも述べたように、L₁₁A はクロスプロテクションに有効な弱毒株を選抜することを目的として、野生型株である L を高温処理後、病徴の弱さを指標とした選抜を繰り返して得られた弱毒ウイルスである (後藤と根本, 1971)。L₁₁A は長年にわたり弱毒株としてトマト栽培現場で用いられており、そのクロスプロテクションのメカニズムについて多くの解析がなされてきたもののいまだに推測の域を出ていない。第 1 章の結果から、L₁₁A は PTGS 抑制能が低下したウイルスであることが明らかとなった。また、上述のように一部のクロスプロテクションには PTGS が関与していることが知られている。したがって、L₁₁A 感染植物におけるクロスプロテクションにも PTGS が関わっていることが予想された。解析を進めたところ、ToMV が感染した細胞に再度 ToMV が感染することができないことを見だし、この性質がクロスプロテクションの主因であろうと考えられた。しかし、この性質の主たる原因は PTGS 以外にあることが強く示唆された。

補足

クロスプロテクションは植物体内でウイルスが感染した領域だけにみられる抵抗性であり、ウイルスが感染していない領域にも誘導される獲得抵抗性とは区別される。

「クロスプロテクション」の定義は 2 つあり、厳密に区別されずに使用されている。広義のクロスプロテクションは、1 次ウイルスの感染が 2 次ウイルスによる発症を妨げることとをさし、2 次ウイルスの増殖の有無は考慮しない。狭義には、1 次ウイルスの感染が 2 次ウイルスの増殖自体を阻害することをさす (Fulton, 1982)。現在では主に狭義に使用されるが、かつては広義に使われていたことが多いと思われる。ここでは狭義に用いた。し

かし $L_{11}A$ に関してクロスプロテクションという場合には、さしあたって広義の意味で用いることにする。 $L_{11}A$ 感染植物での 2 次ウイルス (ToMV-L) の増殖の有無が不明だからである (後述)。

3.2 材料と方法

ウイルスの接種は第 1 章の材料と方法を参照。

プラスミド

• pTL.G3-NsiI

pTL.G3-BstEII (第 1 章、材料と方法の pTLBN.G3 の項に記載) を *BstEII* 消化、末端平滑化、*MluI* 消化した部位に、pbLAB (第 1 章) を *NsiI* 消化、末端平滑化、*MluI* 消化して得られる約 0.2 kb の断片を挿入して、pTL.G3-NsiI を作成した。

pTL.G3-BstEII と pT.G3-NsiI はそれぞれ ToMV-GFP(Δ CP1)および ToMV-GFP(Δ CP2)の感染性トランスクリプト作製の鋳型として用いた。

• pTLBN.R1(J)

pTL.DsRd (第 1 章、材料と方法の pTLBN.R1 の項に記載) を *NsiI* 消化、平滑末端化、*KpnI* 消化して得られる約 2.1kb の断片を pTLJ (第 1 章) の *NcoI* 消化、末端平滑化、*KpnI* 消化した部位に挿入して pTLBN.R1(J)を作製した。

pTLBN.R1、pTLBN.R1(J)および pTL.DsRd は、それぞれ ToMV-RFP、ToMV-RFP(J)および ToMV-RFP(Δ CP2)の感染性トランスクリプトを作製するための鋳型として用いた。

• pTX.R1、pTX.R1(Lseq)

pTopo-DsRd (第 1 章) を *NcoI* 消化、末端平滑化、*SalI* 消化して得られる、改変 RFP をコードする約 0.68 kb の断片を pP2C2S (Baulcombe et al., 1995) の *EcoRV-SalI* 部位に挿入して pTX.R1 を作製した。

pTLW3 を鋳型として *SmaI*-L5755fw および *SmaI*-L5900rv プライマーを用いた PCR により得られる断片 (ToMV の CP ORF 中の、開始コドン ATG を含まない 145 bp をコードする) を *SmaI* 消化して、pTopo-DsRd を *XbaI* 消化後末端平滑化した部位 (RFP 遺伝子の 5' 側) に挿入して、CP ORF と RFP ORF の向きが一致したサブクローンである pTopo-LsD を得た。pTopo-LsD を *ApaI-XhoI* 消化後末端平滑化して得られる約 0.83 kb の断片を pP2C2S の *EcoRV* 部位に挿入して pTX.R1(Lseq)を作製した。

それぞれ PVX-RFP および PVX-RFP(Lseq)の感染性トランスクリプト作製の鋳型として

用いた。

SmaI-L5755fw 5'-GGGCCCCGGGCTGACCCTATAGAATTG

SmaI-L5900rv 5'-GGGCCCCGGGATCGCCAGGAAATCTGACGG

・ p30B-Cyc3、pTPBG

p30B-Cyc3 は、TMV-U1 系統をもとに開発された発現ベクターである p30B (Shivprasad et al., 1999) を母体とし、CP サブゲノム RNA プロモーターから Cycle 3 GFP (Crameri et al., 1996) が発現されるように改変されたプラスミドである。pTPBG は、PMMoV-J 系統の全長 cDNA が T7 プロモーター下流に挿入されたプラスミドである pTPW1 (Kirita et al, 1997) を母体とし、CP サブゲノム RNA プロモーターから erG3GFP (Tamai and Meshi, 2001b) が発現されるように改変されたプラスミドである。(いずれも津田新哉博士より分与)。それぞれ *KpnI* 消化または *XbaI* 消化したのち、TMV-GFP および PMMoV-GFP の感染性トランスクリプト作製の鋳型として用いた。

植物の栽培

植物の栽培は基本的に 26°C で第 1 章の材料と方法と同様に行なった。ただし、PMMoV-GFP は 26°C ではタバコ接種葉でほとんど細胞間移行しないため、PMMoV-GFP を接種したタバコに限り 30°C で栽培した (図 26C)。

プロトプラストへの重複感染実験

プロトプラストへのエレクトロポレーションによるウイルス接種は第 1 章の材料と方法の通りに行なった。20 μ l の mock (滅菌水) または ToMV-RFP トランスクリプトをエレクトロポレーションで 1 次接種した後、10 ml のプロトプラスト培地に懸濁し、暗所、26°C にて 0、4、8 または 12 時間の 1 次培養を行なった。培養後、120xg、3 分間の遠心によりプロトプラストを沈降させて上清を除き、800 μ l のエレクトロポレーションバッファーに再懸濁した。ToMV-GFP または PVX-GFP の感染性トランスクリプト 20 μ l を加えてエレクトロポレーションにより 2 次接種した。バッファーを 10 ml のプロトプラスト培地に置換して、暗所、26°C にて 24 時間の 2 次培養を行なった。遠心によりプロトプラストを回収し、蛍光顕微鏡で明視野像、RFP 蛍光像、GFP 蛍光像を撮影した。

蛍光の観察

実体顕微鏡による GFP 蛍光および RFR 蛍光の観察は第 1 章と同様に行なった。共焦点レーザー顕微鏡は LSM 510 META (Karl Zeiss)を用いた。プロトプラストの観察には蛍光顕微鏡 Axiophoto (Karl Zeiss)を用い、浜松ホトニクス 3CCD Digital Camera C7780 でコンピュータに画像を取り込んだ。

ウイルスの配列解析

ToMV-L (Ohno et al., 1984)、TMV-U1 (Dawson et al., 1986)、PMMoV-J (Kirita et al., 1997)の全長ゲノム配列をもとに、ClustalW (<http://clustalw.genome.jp/>)を用いて系統樹を作製した。相同性の解析は Genetyx-Mac version 12.2.0 (Genetyx Corporation)を用いた。

3.3 結果

L₁₁A 感染上位葉における 2 次ウイルスの挙動

ToMV-L₁₁A があらかじめ感染したトマトやタバコは、強毒な 2 次ウイルスの感染による発病を免れる（後藤と根本, 1971）。第 1 章で述べたように ToMV-L₁₁A は PTGS 抑制能が低下していることや J 変異をもつ ToMV が自身に対する PTGS を抑制できないことから、L₁₁A 感染植物は ToMV 配列に対する PTGS が全身で起き、その結果 2 次ウイルスに抵抗性を示すことが予想された。そこで 2 次ウイルスの感染の有無を確認するための実験を行った。1 次ウイルスとして、モック、ToMV-L₁₁A または ToMV-L を接種し、7 日後に上位葉に 2 次ウイルスとして ToMV-GFP（図 22、第 1 章の TLBN.G3 に相当）を接種し、蛍光を経時観察した。

ToMV-GFP を接種して 6 日後と 10 日後の GFP 蛍光像を図 23 に示す。モック接種タバコおよび L₁₁A 接種タバコでは多数の蛍光スポットが見られたが、L を接種したタバコでは全く感染していなかった（図 23）。コントロールとして PVX-GFP を接種した場合には、1 次ウイルスの種類に関係なく多数の蛍光スポットが観察された（結果省略）。モック接種タバコと L₁₁A 感染タバコにおける ToMV-GFP の広がりかたには、以下の 2 点において差が認められた。第 1 に、モック接種したタバコでは維管束系に沿った GFP 蛍光（図 22A、矢印）が見られたのに対して、L₁₁A 感染タバコではそのような感染部位が見られなかった。第 2 に、モック接種タバコでは ToMV-GFP 接種 10 日後でも感染領域が拡大していたのに対して（図 22A, B）、L₁₁A 感染タバコでは 6 日後には感染領域の拡大がほぼ停止していた（図 23C, D）。

ToMV 配列に対する PTGS が全身で起きていると予想した L₁₁A 感染植物で 2 次ウイルスが感染できたことと、逆に PTGS が抑制されているはずの L 感染タバコで 2 次ウイルスが全く感染できなかったことから、2 次ウイルスが感染できるか否かの決定には、PTGS 以外の要因が重要であることが示唆された。そこで、ToMV-GFP およびレポーターとして RFP を発現する ToMV（ToMV-RFP）を用いて、2 種の ToMV が同一組織（または細胞）に感染した場合のウイルスの挙動を調べることにした。

なお、ToMV-GFP や ToMV-RFP はタバコでは上位葉に移行する能力を欠いているため、1 次ウイルスの全身感染の様子を蛍光で観察することはできなかった（結果省略）。

接種葉における同一細胞への共感染の解析

ToMV-RFP は重複した CP サブゲノム RNA プロモーターの間に RFP ORF をもつ (図 22)。ToMV-GFP と ToMV-RFP をタバコ葉に混合接種して、GFP 蛍光と RFP 蛍光を実体顕微鏡で観察した (図 24A~C)。興味深いことに GFP 蛍光と RFP 蛍光を発する領域は全く重ならず、明確な境界を形成していた。共焦点レーザー顕微鏡で境界部分を観察すると、この境界線は 1 細胞レベルで形成されていた (図 24D~F)。GFP 蛍光と RFP 蛍光をともに発する細胞は皆無ではないがごくまれにしか見つけることができなかった (図 25C)。このように ToMV どうしが同一細胞に共感染しない性質を便宜的に「排他的」と表現することにする。コントロールとして ToMV-GFP と PVX-RFP の組み合わせ (図 24G~L)、または ToMV-RFP と PVX-GFP の組み合わせ (結果省略) で混合接種した場合には、共感染して黄色く見える領域が多数観察され、排他性はないことがわかった。

排他性とウイルスに対する PTGS の関係を調べた。ToMV-GFP と、130K に J 変異をもち PTGS 抑制能が低下した ToMV-RFP(J)を用いて混合接種実験を行い、やはり排他的であったことから (図 25C, D)、排他性は J 変異の有無 (すなわち PTGS 抑制能の強さ) とは無関係であることが分かった。また RFP を発現し、約 150 nt (PTGS のターゲットとしては十分な長さであると思われる) の ToMV 由来配列をもつ PVX-RFP(Lseq) (図 22) と、ToMV-GFP(J)を組み合わせで混合接種した場合には共感染した細胞が多数観察された (図 25E、黄色)。したがって、2 種のウイルスが相同配列をもっていることだけでは、排他性の原因は説明できないと思われた。

序論で触れたように CP が蓄積した細胞にはウイルスが侵入しても脱外被の阻害によって感染が起こらなくなる例が知られている。この場合、ウイルス粒子でなくウイルス RNA を接種すれば感染が成立する (Register and Beachy, 1988)。ToMV の排他性が脱外被阻害によって起きるのかを確かめるため、ToMV-RFP と、CP を発現しない ToMV-GFP(Δ CP1) (図 22) を混合接種した。もし脱外被の阻害が原因なら、ToMV-GFP(Δ CP1)は ToMV-RFP 感染細胞に侵入して (逆も起こると思われる)、共感染が成立するはずである。しかし図 26A に示すように共感染は起こらなかったことから、脱外被阻害が排他性に寄与する割合はごく少ないと思われた。

クロスプロテクションは同種のウイルス間だけでなく、近縁種の間でも起こる (Hull, 2002)。ToMV どうしでみられた排他性が ToMV とその近縁種の間でも起こるのかを調べることにした。TMV、ToMV および *Pepper mild mottle virus* (PMMoV)は *Tobamovirus* に属

する。3 種のウイルスの類縁関係と配列相同性を図 26B に示す。GFP 遺伝子をレポーターとして発現する TMV (U1 系統) および PMMoV (J 系統) (それぞれ TMV-GFP、PMMoV-GFP と呼ぶ) を ToMV-RFP と混合接種して蛍光を観察したところ、ToMV どうしの場合と同様の排他性が見られた (図 26C)。

ToMV と PMMoV との間の塩基配列の相同性はあまり高くなく、配列が完全に一致する部分は最大でも 34 塩基しかない。(前述の PVX-RFP(Lseq)は 150 塩基が完全に一致する。)したがって、共感染の可否を決定するのは配列相同性よりもむしろ細胞間移行や複製のメカニズムの類似性である可能性が考えられた。

たとえば、ひとたび ToMV が感染した細胞では原形質連絡の構造が変化してしまい、ToMV が隣接細胞へ出て行くことはできても、隣接細胞からの侵入はできなくなっている可能性が考えられる。もしこれが原因ならば、ToMV-GFP の GFP 蛍光スポットが広がった後、同じ葉に ToMV-RFP を機械接種すれば、GFP 蛍光を発する細胞の集団のなかに 1 細胞だけ RFP を発する細胞を検出することができるはずである。しかし、そのような細胞を見つけることはできなかった (結果省略。PVX-RFP を接種した場合は GFP 蛍光スポットの中に RFP 蛍光細胞が見いだされた)、排他性の原因を細胞間移行の阻害だけで説明することは難しいと思われた。

ToMV の複製そのものが排他性の原因である可能性も考えられた。いったん ToMV が複製した細胞では複製に必要な細胞内部位あるいは宿主因子が枯渇したり、細胞内環境の変化によって後から侵入したウイルスは複製できないことが考えられる。この仮説が正しいとすると、同一細胞に ToMV-GFP と ToMV-RFP が同時に感染した場合には、共感染すると予想される。また、図 24E に示すような ToMV-GFP と ToMV-RFP の境界領域で共感染している細胞は非常にまれであったことから、1 次ウイルスが感染してからかなり早い時間内に 2 次ウイルスの増殖を許さない状態になることも予想された。これらの点を確認するため、感染時間を厳密にコントロールできるプロトプラスト感染系を用いて実験を行うことにした。

プロトプラスト感染における ToMV の排他性

タバコ培養細胞 BY2 のプロトプラストとウイルス感染性 RNA を混ぜて電氣的パルスを与えると、7 割以上のプロトプラストに同調的に感染させることができる (エレクトロポレーション法)。この方法を用い、1 次ウイルスが感染後、2 次ウイルスの感染ができな

くなるまでの時間を調べた（実験手順は材料と方法に記載）。なお、本実験では CP ORF を完全に除いた ToMV-GFP (Δ CP2)と ToMV-RFP (Δ CP2)を用いた（図 22）。その理由は CP を介したクロスプロテクションが起こる可能性を排除するためと、CP ORF を完全に除いた ToMV の方が強い蛍光を発するので（結果省略）、感染細胞を感度よく検出できるためである。簡便のため本項では ToMV-GFP (Δ CP2)と ToMV-RFP (Δ CP2)をそれぞれ ToMV-GFP と ToMV-RFP と呼ぶことにする。

予備実験として、2 度のエレクトロポレーションと培養をしてもウイルス増殖に影響を与えないのかを調べた。モックを 1 次接種し、0、4、8 または 12 時間培養した（1 次培養）。ToMV-GFP または PVX-GFP を 2 次接種し、2 次培養を 24 時間行ったのち、GFP 蛍光を発する細胞の数を計測した。ToMV-GFP の場合、約 8 割の細胞に感染しており（図 28A 上）、1 度だけの接種を行った場合（図 28A 下、0'(24)）と比較してほぼ同じ感染効率であった。1 次培養の時間の影響もほとんどなかった。PVX-GFP の場合も感染効率は約 4 割と低いものの、1 次培養の時間による影響はほとんど受けなかった（図 28B 上）。したがって、2 度のエレクトロポレーションと培養そのものは 2 次ウイルスの感染効率と増殖に影響を与えないことが確認できた。

次に、1 次ウイルスとして ToMV-RFP を接種後、2 次ウイルスとして ToMV-GFP または PVX-GFP を接種して培養を行い、GFP 蛍光および RFP 蛍光を発する細胞をカウントした。図 27 に蛍光細胞の様子を示す。ToMV-RFP の感染効率は約 8 割であった（図 28A 下と B 下、赤と黄の和）。ToMV-RFP を 1 次接種後すぐに ToMV-GFP を 2 次接種した場合、ToMV-GFP は約 6 割の細胞に感染した。また 2 つのウイルスの共感染は約 4 割の細胞で認められた（図 28A 下、0 h）。ところが ToMV-RFP を接種して 4 時間後に ToMV-GFP を接種した場合には、ToMV-GFP 感染細胞の割合と共感染細胞の割合はともに低下した。1 次培養が 8 時間になると、共感染細胞がほとんど見られなくなった（図 28A 下）。また、RFP 蛍光を発する細胞は 8 割以上あるにも関わらず、GFP 蛍光を発する細胞のうち RFP 蛍光を発する細胞の割合は約 3 割と低かった。このことは ToMV-RFP 感染細胞で ToMV-GFP の増殖阻害がおきていることを意味している。したがって、プロトプラストでも ToMV どうしの排他性が起こることが確認された。2 次ウイルスとして PVX-GFP を接種した場合には、1 次培養の時間が長くなっても GFP 蛍光細胞の割合は低下せず、また PVX-GFP 感染細胞は大部分が ToMV-RFP との共感染を示した（図 28B 下）。

3.4 考察

2 次ウイルスの増殖阻害の要因

プロトプラストを用いた実験から、ToMV の感染後数時間以内に、新たに接種した ToMV の増殖が阻害されることが分かった。本実験では CP を発現しない ToMV を用いたので、この現象は CP を介した抵抗性には無関係である。

また、ToMV 配列を標的とした PTGS が原因である可能性も低いと考えられる。もし 1 次ウイルス感染後数時間以内に PTGS が誘導され、2 次ウイルスの RNA が切断されるのならば、1 次ウイルスの RNA も同じ割合で分解され、増殖が低下するはずである。図 9 で示したように、TLW3 と TLJ の間で感染 8 または 20 時間後においてほとんど蓄積量に差がなかったことは、少なくともこの時間帯で 1 次ウイルスの増殖に影響を及ぼすほど強い PTGS は起きていないことを示唆している。ただしプロトプラストでの 2 次ウイルスの増殖阻害が配列相同性に依存していないことをより明確に証明するためには、PVX-GFP に ToMV 配列をもたせたものとそうでないものを 2 次ウイルスとして接種するなどの実験が必要であろう。

ToMV が感染後に、ウイルスの増殖を阻害する何らかの抵抗性因子が誘導されることが考えられる。PVX の増殖が影響を受けなかったことから、この因子は ToMV 特異的な阻害効果を持つはずである。しかも、すでに複製が始まっている 1 次ウイルスの増殖には影響を与えていないと思われるため、この因子は 2 次ウイルスが感染してから数時間以内におこるイベントだけを阻害するという奇妙な性質をもつ。そのような因子は仮にあったとしてもウイルスの増殖を抑えるためには役に立たないであろうから、実在するかは疑問である。

ToMV の複製に必要な細胞内部位が占め尽くされたり、宿主因子が使い果たされたりした結果、2 次ウイルスが増殖ができなくなった可能性は高い。*Tobamovirus* の複製は小胞体膜または液胞膜に囲まれた複製複合体の中で行われると考えられている (Heinlein et al., 1998; Más and Beachy, 1999; Hagiwara et al., 2003)。シロイヌナズナでは *Tobamovirus* の複製に必要な遺伝子として *TOM1*、*TOM2A* および *TOM3* が同定されており、タバコやトマトにもこれらのホモログが存在する (Yamanaka et al., 2000, 2002; Tsujimoto et al., 2003)。*TOM1* と *TOM3* は複製酵素と相互作用する膜タンパクであり、複製酵素を膜にリクルートすることで複製複合体形成の役割を担うと予想されている。*TOM1* および *TOM2A*、*TOM3* は

Tobamovirus の複製には必要だが *Cucumovirus* や *Bromovirus* の複製には不要である。TOM1 をはじめとする、*Tobamovirus* 特異的に複製をサポートする宿主因子が 1 次ウイルスの複製で使いつくされることで、2 次ウイルスの複製ができなくなったのかもしれない。

ToMV のプラス鎖合成は感染してから約 18 時間後まで持続するが、マイナス鎖合成は約 6 時間後には停止する (Ishikawa et al., 1991b)。この時間は、1 次ウイルス感染後に 2 次ウイルスの共感染効率が急減する時間とよく一致する (図 27)。複製複合体は感染後 6 時間以内に形成され、それ以降は細胞内環境の変化、宿主因子や細胞内部位の枯渇などにより新たな形成がおこらなくなることも考えられる。

接種葉での排他性

接種葉では ToMV-GFP と ToMV-RFP の感染領域の間に 1 細胞レベルの境界線が形成され、共感染細胞はほとんど存在しなかった。接種葉での排他性もプロトプラストの場合と同様に両ウイルスの感染の時間差が原因なのだろうか。TMV が 1 細胞だけ細胞間移行するのに 3~4 時間しか要さないことから (Kawakami et al., 2004) (本研究の ToMV-GFP と ToMV-RFP はこれよりやや長い時間が必要かもしれない)、両ウイルスが 6 時間未満の時間差で侵入する頻度はかなり高いと考えられる。6 時間未満の時間差で侵入した細胞のうち少なくとも 1 割は共感染が成立すると思われる (図 28A)。したがって共感染細胞は一定の頻度で存在すると予想されるが、実際には非常にまれにしか見つからなかった。よって感染葉では、ウイルス感染の時間差から生じる増殖阻害の他に、共感染を妨げる要因があることが推察される。たとえば一方のウイルスが侵入した細胞では非常に短時間のうちに原形質連絡の構造が変化して、一方向の移行しか許さなくなるのかもしれない。

PVX と ToMV は、互いに排除し合うことなく、あたかも独立に感染しているかのような挙動を示した。これは PVX と ToMV の間に複製や細胞間移行の機構に共通する部分が少ないからであろう (Tamai and Meshi, 2001a)。逆に ToMV の近縁種である TMV と PMMoV は複製や細胞間移行の機構に ToMV と共通する部分が多いために、互いに排他的となることが示唆される。また本研究の結果は、少なくとも CP を介した抵抗性または PTGS が *Tobamovirus* 間の排他性の主因ではないことを示唆している

近縁のウイルスどうしが接種葉で空間的に互いを排除しあう現象は、PVX どうしの間や、*Alfalfa mosaic virus* (AMV) の異なる系統間、異なるサブグループに属する CMV 間、同種または異種の *Potyvirus* の間でもおこることが知られているが、メカニズムの解明は

今後の課題として残されている (Divéki et al., 2002; Hull and Plaskitt, 1970; Takeshita et al., 2004; Dietrich and Maiss, 2003)。

L_{II}A によるクロスプロテクション

以上の考察をもとに、図 23 で示した上位葉での 2 次ウイルスの挙動を見直すことにする。

1 次ウイルスが ToMV-L の場合、2 次ウイルスは上位葉に全く感染できなかった。この上位葉はモザイク症状を発していた。したがってウイルスが多量に蓄積している YT の細胞には、ToMV とうしの排他性により感染できなかったのだろう。また、DGI の一部 (YT との境界部) は、ToMV に対する PTGS が起きているために感染できなかったと考えられる (第 2 章、図 21)。ToMV が感染しておらず、PTGS も起きていない DGI の中心部には感染できそうであるが、感染スポットは見つからなかった。一つには ToMV の形成する DGI がごく小さいため、そのような領域が非常に狭いことが考えられる。あるいは上位葉に全身獲得抵抗性や局部抵抗性が誘導され、感染効率が極端に低下したのかもしれない。2 次ウイルスの感染を阻止するという意味でなら、ToMV-L は (L_{II}A よりも) 強いクロスプロテクション効果を発揮すると言えよう。しかし L は強い病徴を引き起こすことから、農学的なクロスプロテクションの定義にはあてはまらない。

L_{II}A 感染上位葉には 2 次ウイルスが部分的に感染した。少なくともこの領域には L_{II}A が感染していなかったことを意味する。L と比較して L_{II}A は上位葉への移行が遅いため、上位葉に未感染領域が存在したのかもしれない。L_{II}A に関しては報告がないが、サプレッサー活性が低下した TMV 弱毒株である M 系統は、複製量や細胞間移行は正常なのにも関わらず上位葉への移行が遅れることが知られている (Nelson et al, 1993)。

L_{II}A の長距離移行の早さは正常だが感染上位葉での移行が遅いという可能性も考えられる。Watanabe ら (1987b) は、L_{II}A の MP の発現量が少なく、そのために細胞間移行が遅いのではないかと推測した。しかし、TLW3 と比較して TLJ や TLJA1 の MP の発現量に差がないことや局部壊死斑の大きさが同程度であったこと (結果省略)、TLBN.G3 や TLBN.G3(J)の感染スポットの大きさに違いが見られなかったことから (図 11)、MP の発現量の低下により細胞間移行能が低下しているとは考えにくい。それよりも、L_{II}A に対する PTGS が、ウイルスの感染拡大を妨げているのではないだろうか。図 21 で示したモザイク形成機構のモデルに従えば、L_{II}A 感染上位葉でウイルス感染が拡大する過程のど

こかで PTGS シグナルが先行して PTGS 領域が形成され、感染拡大を阻止すると考えられる。L₁₁A の PTGS 抑制能は弱いために PTGS 領域は早く形成され、ウイルスがさほど広がっていない段階で感染拡大が停止する。感染しなかった領域は pseudo DGT と同様ウイルスに対する抵抗性がなく、2 次ウイルスの感染が成立する。

2 次ウイルスは感染できたが、その後の感染領域の拡大は明らかに阻止されていた (図 23)。2 次ウイルスの感染拡大は PTGS 領域によって阻止されたと考えられるが、PTGS がまだ成立していない領域があったとしても L₁₁A が感染している細胞には再感染できず、いずれにしても感染拡大は停止する (図 29)。モック接種では維管束に沿った感染が見られたが L₁₁A 感染葉では見られなかったことは、2 次ウイルスが維管束系を介した上位葉への移行も阻止されていることを示唆する。強毒株が感染しても上位葉への侵入ができなければモザイクは発病しない。

優れた弱毒株とは？

当初の予想では、L₁₁A は自身に対する PTGS を誘導しやすいウイルスであり、PTGS に起因するウイルス抵抗性がクロスプロテクションを生み出していると思われた。しかし本研究の結果は、(発病を防ぐという意味の) クロスプロテクションは L₁₁A の全身感染だけでも生み出され、PTGS の寄与は小さいことを示唆している。クロスプロテクション効果をもつ ToMV 弱毒株に求められる性質は第一に無病徴性と全身感染性であると判断される。

もちろん、L₁₁A の PTGS 抑制能の低下が無病徴性につながった可能性は高い。また、もし PTGS 抑制能が低下しすぎれば、全身感染できないウイルスになってしまうだろう。L₁₁A は PTGS 抑制能が適度に低下した結果、優秀な弱毒ウイルスとしての性質を備えたと思われる。

結論と今後の展望

本研究ではまず *Tobamovirus* の PTGS 抑制能の解析を行ない、その知見をもとにモザイク病とクロスプロテクションについても解析を行なった。

Tobamovirus の複製酵素 130K が PTGS 抑制能をもつことを明らかにし、130K は新規 RISC の形成を阻害することで PTGS を抑制することが示唆された。今後の課題として最初に挙げられるのは、130K の PTGS 抑制メカニズムを分子レベルで明らかにすることである。*Tombusvirus* の p19 は siRNA と結合して PTGS を抑制することが示され、これがサプレッサーの作用機構を分子レベルで解明した唯一の例である (Silhavy et al., 2002; Lakatos et al., 2004)。130K についても生化学的なアプローチにより、PTGS 経路のどこを抑えているのかを解明するべきである。また、そこから PTGS に関与する植物側の因子が同定できると期待される。

130K の変異によりウイルスの PTGS 抑制能と病原性が変化した。抑制能の低下と病原性の低下はいかなる関係にあるのか、現時点で明確な答えはない。PTGS 抑制能低下によってウイルス量が低下し、病徴が弱くなったとも考えられる。しかしウイルス量と病徴の強さが常に相関するわけではなく (PMMoV の結果、津田新哉博士の私信)、これは今後の検討課題である。サプレッサーが miRNA 経路を阻害する強さを調査することが、手がかりとなるかもしれない。

ウイルス感染の状況下で PTGS 抑制能を見る silencing reversal assay は、本研究では *N. tabacum* の PTGS 系統である G3Sm2 を用いたが (Kubota et al., 2003)、それ以外はすべて *N. benthamiana* で行なわれている (Voinnet, 2001)。*N. benthamiana* はサリチル酸により誘導される RdRP の 1 つが欠損しており、ウイルス感受性と VIGS 誘導活性が著しく増加した植物種であることが示唆されている (Yang et al., 2004)。これまで *N. benthamiana* を用いて解析されたウイルスも G3Sm2 で解析してみれば、病徴や PTGS 抑制能についてこれまでと違った見解が得られるかもしれない。予備的な実験から、PVX や CMV 感染でも G3Sm2 の GFP 蛍光が復活し、TMV とは異なるパターンであることが分かっている。

モザイクのパターン形成は、従来考えられていたような DGI の中心から PTGS シグナルが拡散するという単純なモデルでは説明できず、また PTGS だけでも説明できないことが分かった。パターン形成機構を解明するためには、ウイルスの複製、移行、PTGS シグ

ナルの生成と移行、葉の発生に関する深い理解が必要である。また、サプレッサーを強制発現させたタバコや、PTGS に必要な遺伝子の発現を (RNAi 法などで) 抑制したタバコでモザイク病徴を調べることで、モザイク形成に対する PTGS の関与をより明確にできるだろう。アンチセンス法により RdRP の 1 つを発現抑制したタバコでは TMV に対する感受性が増し、モザイクが生じなくなるとの興味深い報告がなされている (Xie et al., 2001)。

モザイク病の発症メカニズムはパターン形成だけでなく、葉の形や細胞形態の異常、緑色の濃さの違いが生じる原因を解明することも重要であるが、これらについても miRNA 経路の関与が予想される。葉の発生に関与するいくつかの遺伝子は miRNA によって発現が制御されることが知られている (Palatnik, et al., 2003; McHale and Koning, 2004)。これらの遺伝子の発現を DGT と YT で比較することで、モザイク病の原因の一端を明らかにできるかもしれない。

クロスプロテクションに関して、2 種類のレポーター遺伝子を導入した ToMV を BY2 プロトプラストへの感染実験に用いることで、クロスプロテクションが感染後数時間で、1 細胞レベルで起こることが分かった。本研究の結果は、ToMV どうしのクロスプロテクションが CP を介した抵抗性や PTGS その他の塩基配列に依存する抵抗性である可能性が低いことを示しているが、ではクロスプロテクションの実体は何か？という問いにはまだ答えることができない。

植物体でのクロスプロテクションは、ウイルスの複製、細胞間移行、長距離移行、獲得抵抗性、PTGS など、ウイルス増殖をさまざまなレベルで複合的に阻害した結果であると想像される。しかし、プロトプラストレベルで観察された排他性こそがクロスプロテクションの主因であり本質であると考えられる。本研究で行なったプロトプラストでの実験は、クロスプロテクションを最も単純化したモデル系となりうる。この実験系をベースとして、クロスプロテクションの原因を探っていくことが可能ではないだろうか。

クロスプロテクションをさらに単純化することも可能かもしれない。Komoda ら (2004) は BY2 の細胞質抽出物をもとに、ウイルスの複製を *in vitro* で行なわせる実験系を開発した。この系を用いてクロスプロテクションを *in vitro* で再現できれば、クロスプロテクションの本質にさらに近づくことができるだろう。

弱毒株によるクロスプロテクションはウイルス病防除に用いられてきた。本研究の結果から、優れた弱毒ウイルスとして第一に求められる性質は無病徴で全身感染することであり、それは PTGS 抑制能の低下によっても生み出されることが示唆された。これまで弱毒

株は突然変異したウイルスの選抜にたよって開発されてきたが (Fulton, 1986)、サプレッサーやその他の病原決定因子に限定して変異を導入することで、弱毒ウイルス開発の効率化がはかれるかもしれない。

モザイク病とクロスプロテクションは現象としては古くから知られていながら、メカニズムがほとんど解明されていない点で共通している。植物ウイルス感染にはこのような「古くて新しい」問題がたくさん残されている。本研究がこれらの解明にむすびつくことを願っている。

謝辞

本研究を行うにあたり、直接ご指導いただいた独立行政法人農業生物資源研究所の飯哲夫生理機能研究グループ長（前京都大学大学院理学研究科助教授）ならびに指導教官としてご指導いただいた京都大学大学院理学研究科の西村いくこ教授に深く感謝いたします。

数々の実験材料を分与していただき、多岐にわたる惜しみないご支援をいただいた独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構中央農業総合研究センターの津田新哉主任研究官と、私が研究室に入ってから以来常にご指導とご助言をいただき、実験材料を提供してくださった科学技術振興機構 CREST 研究員の玉井敦史博士に深く感謝いたします。

抗 130K 抗体と pT732 を分与していただいた農業生物資源研究所の石川雅之耐病性研究チーム長、TMV-OM を分与していただいた農業生物資源研究所の大橋祐子特待研究員、PVX ベクターを分与していただいた Sainsbury Laboratory の David Baulcombe 博士、アグロバクテリウムとバイナリーベクターを分与していただいた University of California の Barbara Baker 博士、small RNA の解析手法についてご助言をいただいた University of South Carolina の Vicki B. Vance 博士に深く感謝いたします。

また、研究に関する助言、議論を行なってくださいました京都大学大学院理学研究科植物分子細胞生物学研究室および農業生物資源研究所耐病性研究チームの諸氏に厚くお礼申し上げます。

引用文獻

- Ahlquist, P. (2002) RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science*, **296**, 1270-1273.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H. and Vance, V.B. (1998) A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13079-13084.
- Atkinson, P.H. and Matthews, R.E. (1967) Distribution of tobacco mosaic virus in systemically infected tobacco leaves. *Virology*, **32**, 171-173.
- Atkinson, P.H. and Matthews, R.E.F. (1970) On the origin of dark green tissue in tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Virology*, **40**, 344-356.
- Baulcombe, D. (2004) RNA silencing in plants. *Nature*, **431**, 356-363.
- Baulcombe, D.C., Chapman, S. and Santa Cruz, S. (1995) Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J.*, **7**, 1045-1053.
- Bawden, F.C. and Kassanis, B. (1945) The suppression of one plant virus by another. *Annals of Applied Biology*, **32**, 52-57.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **409**, 363-366.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.H., Ding, S.W. and Baulcombe, D.C. (1998) Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.*, **17**, 6739-6746.
- Bucher, E., Sijen, T., De Haan, P., Goldbach, R. and Prins, M. (2003) Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *J. Virol.*, **77**, 1329-1336.
- Campbell, R.E., Tour, O., Palmer, A.E., Steinbach, P.A., Baird, G.S., Zacharias, D.A. and Tsien, R.Y. (2002) A monomeric red fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 7877-7882.
- Canto, T., MacFarlane, S.A. and Palukaitis, P. (2004) ORF6 of Tobacco mosaic virus is a

- determinant of viral pathogenicity in *Nicotiana benthamiana*. *J. Gen. Virol.*, **85**, 3123-3133.
- Chalcroft, J. and Matthews, R.E. (1966) Cytological changes induced by turnip yellow mosaic virus in Chinese cabbage leaves. *Virology*, **28**, 555-562.
- Chalcroft, J. and Matthews, R.E. (1967a) Virus strains and leaf ontogeny as factors in the production of leaf mosaic patterns by turnip yellow mosaic virus. *Virology*, **33**, 167-171.
- Chalcroft, J.P. and Matthews, R.E. (1967b) Role of virus strains and leaf ontogeny in the production of mosaic patterns by turnip yellow mosaic virus. *Virology*, **33**, 659-673.
- Chapman, E.J., Prokhnevsky, A.I., Gopinath, K., Dolja, V.V. and Carrington, J.C. (2004) Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev*, **18**, 1179-1186.
- Covey, S.N., Al-Kaff, N.S., Lángara, A. and Turner, D.S. (1997) Plants combat infection by gene silencing. *Nature*, **385**, 781-782.
- Crameri, A., Whitehorn, E.A., Tate, E. and Stemmer, W.P. (1996) Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat. Biotechnol.*, **14**, 315-319.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S. and Baulcombe, D.C. (2000) An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*, **101**, 543-553.
- Dalmay, T., Horsefield, R., Braunstein, T.H. and Baulcombe, D.C. (2001) SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO J.*, **20**, 2069-2078.
- Dawson, W.O., Beck, D.L., Knorr, D.A. and Grantham, G.L. (1986) cDNA cloning of the complete genome of tobacco mosaic virus and production of infectious transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1832-1836.
- Dietrich, C. and Maiss, E. (2003) Fluorescent labelling reveals spatial separation of potyvirus populations in mixed infected *Nicotiana benthamiana* plants. *J. Gen. Virol.*, **84**, 2871-2876.
- Ding, S.W., Li, W.X. and Symons, R.H. (1995) A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *EMBO J.*, **14**, 5762-5772.
- Ding, X.S., Liu, J., Cheng, N.H., Folimonov, A., Hou, Y.M., Bao, Y., Katagi, C., Carter, S.A. and

- Nelson, R.S. (2004) The Tobacco mosaic virus 126-kDa protein associated with virus replication and movement suppresses RNA silencing. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **17**, 583-592.
- Divéki, Z., Salanki, K. and Balazs, E. (2002) Limited utility of blue fluorescent protein (BFP) in monitoring plant virus movement. *Biochimie*, **84**, 997-1002.
- Dugas, D.V. and Bartel, B. (2004) MicroRNA regulation of gene expression in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **7**, 512-520.
- Dunoyer, P., Lecellier, C.H., Parizotto, E.A., Himber, C., Voinnet, O., Moissiard, G. and Ritzenthaler, C. (2004) Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell*, **16**, 1235-1250.
- Erickson, F.L., Holzberg, S., Calderon-Urrea, A., Handley, V., Axtell, M., Corr, C. and Baker, B. (1999) The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defence response in tobacco. *Plant J.*, **18**, 67-75.
- Fagard, M., Boutet, S., Morel, J.B., Bellini, C. and Vaucheret, H. (2000) AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 11650-11654.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- Fraser, R.S.S. (1998) Introduction to classical crossprotection. In Foster, D.G. (ed.) *Plant virology protocols*. Humana Press, Totowa, New Jersey, Vol. 81, pp. 13-24.
- Fulton, R.W. (1982) The protective effects of systemic virus infection. In Wood, R.K.S. (ed.) *Active defence mechanisms in plants*. Plenum Press, New York, pp. 231-245.
- Fulton, R.W. (1986) Practices and precautions in the use of cross protection for plant virus disease control. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **24**, 67-81.
- Grayburn, W.S. (1997) Plant transformation techniques and vectors. In Dashek, W.V. (ed.) *Methods in plant biochemistry and molecular biology*. CRC Press LLC, Boca Raton, Fla., pp. 361-376.
- Guo, H.S. and Ding, S.W. (2002) A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene

- silencing signal. *EMBO J.*, **21**, 398-407.
- Guo, H.S. and García, J.A. (1997) Delayed resistance to plum pox potyvirus mediated by a mutated RNA replicase gene: Involvement of a gene-silencing mechanism. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **10**, 160-170.
- Hagiwara, Y., Komoda, K., Yamanaka, T., Tamai, A., Meshi, T., Funada, R., Tsuchiya, T., Naito, S. and Ishikawa, M. (2003) Subcellular localization of host and viral proteins associated with tobamovirus RNA replication. *EMBO J.*, **22**, 344-353.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. and Baulcombe, D. (2002) Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.*, **21**, 4671-4679.
- Hamilton, A.J. and Baulcombe, D.C. (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, **286**, 950-952.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G.J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, **404**, 293-296.
- Heinlein, M., Padgett, H.S., Gens, J.S., Pickard, B.G., Casper, S.J., Epel, B.L. and Beachy, R.N. (1998) Changing patterns of localization of the tobacco mosaic virus movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection. *Plant Cell*, **10**, 1107-1120.
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C. and Voinnet, O. (2003) Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J.*, **22**, 4523-4533.
- Honda, Y. and Matsui, C. (1974) Electron microscopy of cucumber mosaic virus-infected tobacco leaves showing mosaic symptoms. *Phytopathology*, **64**, 534-539.
- Hull, R. (2002) Matthews' plant virology. Academic Press Ltd., London, England.
- Hull, R. and Plaskitt, A. (1970) Electron microscopy on the behavior of two strains of alfalfa mosaic virus in mixed infections. *Virology*, **42**, 773-776.
- Ishikawa, M., Kroner, P., Ahlquist, P. and Meshi, T. (1991a) Biological activities of hybrid RNAs generated by 3'-end exchanges between tobacco mosaic and brome mosaic viruses. *J. Virol.*, **65**, 3451-3459.

- Ishikawa, M., Meshi, T., Motoyoshi, F., Takamatsu, N. and Okada, Y. (1986) In vitro mutagenesis of the putative replicase genes of tobacco mosaic virus. *Nucleic Acids Res.*, **14**, 8291-8305.
- Ishikawa, M., Meshi, T., Ohno, T. and Okada, Y. (1991b) Specific cessation of minus-strand RNA accumulation at an early stage of tobacco mosaic virus infection. *J. Virol.*, **65**, 861-868.
- Johansen, L.K. and Carrington, J.C. (2001) Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the Agrobacterium-mediated transient expression system. *Plant Physiol.*, **126**, 930-938.
- Jorgensen, R.A., Atkinson, R.G., Forster, R.L. and Lucas, W.J. (1998) An RNA-based information superhighway in plants. *Science*, **279**, 1486-1487.
- Kasschau, K.D. and Carrington, J.C. (1998) A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell*, **95**, 461-470.
- Kasschau, K.D., Cronin, S., Carrington, J.C., Ding, S.W., Li, W.X. and Symons, R.H. (1997) Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology*, **228**, 251-262.
- Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A. and Carrington, J.C. (2003) P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev. Cell*, **4**, 205-217.
- Kawakami, S. and Watanabe, Y. (1997) Use of green fluorescent protein as a molecular marker tag of protein movement in vivo. *Plant Biotech.*, **14**, 127-130.
- Kawakami, S., Watanabe, Y. and Beachy, R.N. (2004) Tobacco mosaic virus infection spreads cell to cell as intact replication complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 6291-6296.
- Kiho, Y. and Nishiguchi, M. (1984) Unique nature of an attenuated strain of tobacco mosaic virus: autoregulation. *Microbiol. Immunol.*, **28**, 589-599.
- Kirita, M., Akutsu, K., Watanabe, Y. and Tsuda, S. (1997) Nucleotide sequence of the Japanese isolate of pepper mild mottle tobamovirus (TMV-P) RNA. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, **63**, 373-376.
- Komoda, K., Naito, S. and Ishikawa, M. (2004) Replication of plant RNA virus genomes in a cell-free extract of evacuated plant protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 1863-1867.

- Kubota, K., Tsuda, S., Tamai, A. and Meshi, T. (2003) Tomato mosaic virus replication protein suppresses virus-targeted posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.*, **77**, 11016-11026.
- Kumagai, M.H., Donson, J., della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K. and Grill, L.K. (1995) Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1679-1683.
- Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D. and Burgyan, J. (2004) Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO J.*, **23**, 876-884.
- Lewandowski, D.J. and Dawson, W.O. (1993) A single amino acid change in tobacco mosaic virus replicase prevents symptom production. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **6**, 157-160.
- Lindbo, J.A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W.M. and Dougherty, W.G. (1993) Induction of a Highly Specific Antiviral State in Transgenic Plants: Implications for Regulation of Gene Expression and Virus Resistance. *Plant Cell*, **5**, 1749-1759.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L. and Hannon, G.J. (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, **305**, 1437-41.
- Llave, C., Kasschau, K.D. and Carrington, J.C. (2000) Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 13401-13406.
- Loebenstein, G., Cohen, J., Shabtai, S., Coutts, R.H. and Wood, K.R. (1977) Distribution of cucumber mosaic virus in systemically infected tobacco leaves. *Virology*, **81**, 117-125.
- Mallory, A.C., Ely, L., Smith, T.H., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L. and Vance, V.B. (2001) HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell*, **13**, 571-583.
- Mallory, A.C., Reinhart, B.J., Bartel, D., Vance, V.B. and Bowman, L.H. (2002) A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15228-15233.
- Martin, T., Wohner, R.-V., Hummel, S., Willmitzer, L. and Frommer, W.B. (1992) The GUS reporter system as a tool to study plant gene expression. In Gallagher, S.R. (ed.) GUS protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression. Academic Press, Inc., San

Diego, Calif., pp. 23-43.

- Más, P. and Beachy, R.N. (1999) Replication of tobacco mosaic virus on endoplasmic reticulum and role of the cytoskeleton and virus movement protein in intracellular distribution of viral RNA. *J. Cell Biol.*, **147**, 945-958.
- Matthews, R.E.F. (1991) Plant virology. Academic Press Ltd., London, England.
- McHale, N.A. and Koning, R.E. (2004) MicroRNA-directed cleavage of *Nicotiana sylvestris* PHAVOLUTA mRNA regulates the vascular cambium and structure of apical meristems. *Plant Cell*, **16**, 1730-1740.
- McKinney, H.H. (1929) Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa, and Gibraltar. *Journal of Agricultural Research*, **39**, 557-578.
- Meshi, T., Ishikawa, M., Motoyoshi, F., Semba, K. and Okada, Y. (1986) In vitro transcription of infectious RNAs from full-length cDNAs of tobacco mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5043-5047.
- Mlotshwa, S., Voinnet, O., Mette, M.F., Matzke, M., Vaucheret, H., Ding, S.W., Pruss, G. and Vance, V.B. (2002) RNA silencing and the mobile silencing signal. *Plant Cell*, **14**, S289-301.
- Moore, C.J., Sutherland, P.W., Forster, R.L., Gardner, R.C. and MacDiarmid, R.M. (2001) Dark green islands in plant virus infection are the result of posttranscriptional gene silencing. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **14**, 939-946.
- Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Jouette, D., Lacombe, A.M., Nikic, S., Picault, N., Remoue, K., Sanial, M., Vo, T.A. and Vaucheret, H. (2000) Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*, **101**, 533-542.
- Más, P. and Beachy, R.N. (1999) Replication of tobacco mosaic virus on endoplasmic reticulum and role of the cytoskeleton and virus movement protein in intracellular distribution of viral RNA. *J. Cell. Biol.*, **147**, 945-958.
- Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R. (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, **2**, 279-289.

- Nelson, R.S., Li, G., Hodgson, R.A.J., Beachy, R.N. and Shintaku, M.H. (1993) Impeded phloem-dependent accumulation of the masked strain of tobacco mosaic virus. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **6**, 45-54.
- Nishiguchi, M., Kikuchi, S., Kiho, Y., Ohno, T., Meshi, T. and Okada, Y. (1985) Molecular basis of plant viral virulence; the complete nucleotide sequence of an attenuated strain of tobacco mosaic virus. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 5585-5590.
- Nishiguchi, M., Motoyoshi, F. and Oshima, N. (1990) Comparison of virus production in infected plants between an attenuated tomato strain (L₁₁A) and wild strain (L) of tobacco mosaic virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, **56**, 691-694.
- Nozu, Y. and Okada, Y. (1968) Amino acid sequence of a common Japanese strain of tobacco mosaic virus. *J. Mol. Biol.*, **35**, 643-646.
- Ohno, T., Aoyagi, M., Yamanashi, Y., Saito, H., Ikawa, S., Meshi, T. and Okada, Y. (1984) Nucleotide sequence of the tobacco mosaic virus (tomato strain) genome and comparison with the common strain genome. *J. Biochem. (Tokyo)*, **96**, 1915-1923.
- Oshima, N. (1981) Control of tomato mosaic disease by attenuated virus. *Jpn. Agric. res. Q.*, **14**, 222-228.
- Palatnik, J.F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J.C. and Weigel, D. (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, **425**, 257-263.
- Palauqui, J.C., Elmayan, T., Pollien, J.M. and Vaucheret, H. (1997) Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J.*, **16**, 4738-4745.
- Palauqui, J.C. and Vaucheret, H. (1998) Transgenes are dispensable for the RNA degradation step of cosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9675-9680.
- Palukaitis, P. and Zaitlin, M. (1984) A model to explain the cross protection phenomenon shown by plant viruses and viroids. In *Plant-Microbe Interactions: Molecular and Genetic Perspectives.*, Kosuge, T. and Nester, E.W. (eds.), p. 420. MacMillan; New York, USA
- Pennazio, S., Roggero, P. and Conti, M. (2001) A history of plant virology. Cross protection. *New Microbiol.*, **24**, 99-114.
- Plasterk, R.H. (2002) RNA silencing: the genome's immune system. *Science*, **296**, 1263-1265.

- Palatnik, J.F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J.C. and Weigel, D. (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, **425**, 257-263.
- Powell-Abel, P.A., Nelson, R.S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S.G., Fraley, R.T. and Beachy, R.N. (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, **232**, 738-743.
- Pruss, G., Ge, X., Shi, X.M., Carrington, J.C. and Bowman Vance, V. (1997) Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell*, **9**, 859-868.
- Qu, F., Ren, T. and Morris, T.J. (2003) The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *J. Virol.*, **77**, 511-522.
- Ratcliff, F., Harrison, B.D. and Baulcombe, D.C. (1997) A similarity between viral defence and gene silencing in plants. *Science*, **276**, 1558-1560.
- Ratcliff, F.G., MacFarlane, S.A. and Baulcombe, D.C. (1999) Gene silencing without DNA. RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell*, **11**, 1207-1216.
- Register, J.C., 3rd and Beachy, R.N. (1988) Resistance to TMV in transgenic plants results from interference with an early event in infection. *Virology*, **166**, 524-532.
- Reid, M.S. and Matthews, R.E. (1966) On the origin of the mosaic induced by turnip yellow mosaic virus. *Virology*, **28**, 563-570.
- Ruiz, M.T., Voinnet, O. and Baulcombe, D.C. (1998) Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell*, **10**, 937-946.
- Schauer, S.E., Jacobsen, S.E., Meinke, D.W. and Ray, A. (2002) DICER-LIKE1: blind men and elephants in Arabidopsis development. *Trends. Plant Sci.*, **7**, 487-491.
- Scholthof, K.B. (2004) Tobacco mosaic virus: a model system for plant biology. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **42**, 13-34.
- Shivprasad, S., Pogue, G.P., Lewandowski, D.J., Hidalgo, J., Donson, J., Grill, L.K. and Dawson, W.O. (1999) Heterologous sequences greatly affect foreign gene expression in tobacco mosaic virus-based vectors. *Virology*, **255**, 312-323.

- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H. and Fire, A. (2001) On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, **107**, 465-76.
- Silhavy, D., Molnar, A., Lucioli, A., Szittya, G., Hornyik, C., Tavazza, M. and Burgyan, J. (2002) A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J.*, **21**, 3070-3080.
- Smith, C.J., Watson, C.F., Bird, C.R., Ray, J., Schuch, W. and Grierson, D. (1990) Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogenous gene in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.*, **224**, 477-481.
- Suzuki, N., Kudo, T., Shirako, Y., Ehara, Y. and Tachibana, T. (1989) Distribution of cylindrical inclusion, amorphous inclusion and capsid proteins of watermelon mosaic virus 2 in systemically infected pumpkin leaves. *J. Gen. Virol.*, **70**, 1085-1091.
- Szittya, G., Silhavy, D., Molnar, A., Havelda, Z., Lovas, A., Lakatos, L., Banfalvi, Z. and Burgyan, J. (2003) Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO J.*, **22**, 633-640.
- Takeda, A., Sugiyama, K., Nagano, H., Mori, M., Kaido, M., Mise, K., Tsuda, S. and Okuno, T. (2002) Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus. *FEBS Lett.*, **532**, 75-79.
- Takeshita, M., Shigemune, N., Kikuhara, K., Furuya, N. and Takanami, Y. (2004) Spatial analysis for exclusive interactions between subgroups I and II of Cucumber mosaic virus in cowpea. *Virology*, **328**, 45-51.
- Tamai, A., Kubota, K., Nagano, H., Yoshii, M., Ishikawa, M., Mise, K. and Meshi, T. (2003) Cucumovirus- and bromovirus-encoded movement functions potentiate cell-to-cell movement of tobamo- and potexviruses. *Virology*, **315**, 56-67.
- Tamai, A. and Meshi, T. (2001a) Cell-to-cell movement of Potato virus X: the role of p12 and p8 encoded by the second and third open reading frames of the triple gene block. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **14**, 1158-1167.
- Tamai, A. and Meshi, T. (2001b) Tobamoviral movement protein transiently expressed in a single epidermal cell functions beyond multiple plasmodesmata and spreads multicellularly in an infection-coupled manner. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **14**, 126-134.

- Tang, G., Reinhart, B.J., Bartel, D.P. and Zamore, P.D. (2003) A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev.*, **17**, 49-63.
- Thomas, C.L., Leh, V., Lederer, C. and Maule, A.J. (2003) Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology*, **306**, 33-41.
- Tsujimoto, Y., Numaga, T., Ohshima, K., Yano, M.A., Ohsawa, R., Goto, D.B., Naito, S. and Ishikawa, M. (2003) Arabidopsis TOBAMOVIRUS MULTIPLICATION (TOM) 2 locus encodes a transmembrane protein that interacts with TOM1. *EMBO J.*, **22**, 335-343.
- Van Der Krol, A.R., Mur, L.A., Beld, M., Mol, J.N. and Stuitje, A.R. (1990) Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*, **2**, 291-299.
- Voinnet, O. (2001) RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.*, **17**, 449-459.
- Voinnet, O. (2002) RNA silencing: small RNAs as ubiquitous regulators of gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **5**, 444-451.
- Voinnet, O. and Baulcombe, D.C. (1997) Systemic signalling in gene silencing. *Nature*, **389**, 553.
- Voinnet, O., Lederer, C. and Baulcombe, D.C. (2000) A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell*, **103**, 157-167.
- Voinnet, O., Pinto, Y.M. and Baulcombe, D.C. (1999) Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 14147-14152.
- Voinnet, O., Vain, P., Angell, S. and Baulcombe, D.C. (1998) Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell*, **95**, 177-187.
- Watanabe, T., Honda, A., Iwata, A., Ueda, S., Hibi, T. and Ishihama, A. (1999) Isolation from tobacco mosaic virus-infected tobacco of a solubilized template-specific RNA-dependent RNA polymerase containing a 126K/183K protein heterodimer. *J. Virol.*, **73**, 2633-2640.
- Watanabe, Y., Meshi, T. and Okada, Y. (1987a) Infection of tobacco protoplasts with in vitro transcribed tobacco mosaic virus RNA using an improved electroporation method. *FEBS Lett.*, **219**, 65-69.

- Watanabe, Y., Morita, N., Nishiguchi, M. and Okada, Y. (1987b) Attenuated strains of tobacco mosaic virus. Reduced synthesis of a viral protein with a cell-to-cell movement function. *J. Mol. Biol.*, **194**, 699-704.
- Waterhouse, P.M., Wang, M.B. and Lough, T. (2001) Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, **411**, 834-842.
- Xie, Z., Fan, B., Chen, C. and Chen, Z. (2001) An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 6516-6521.
- Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E. and Carrington, J.C. (2004) Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol.*, **2**, 642-652.
- Yamanaka, T., Imai, T., Satoh, R., Kawashima, A., Takahashi, M., Tomita, K., Kubota, K., Meshi, T., Naito, S. and Ishikawa, M. (2002) Complete inhibition of tobamovirus multiplication by simultaneous mutations in two homologous host genes. *J. Virol.*, **76**, 2491-2497.
- Yamanaka, T., Ohta, T., Takahashi, M., Meshi, T., Schmidt, R., Dean, C., Naito, S. and Ishikawa, M. (2000) TOM1, an Arabidopsis gene required for efficient multiplication of a tobamovirus, encodes a putative transmembrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10107-10112.
- Yang, S.J., Carter, S.A., Cole, A.B., Cheng, N.H. and Nelson, R.S. (2004) A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 6297-6302.
- Yelina, N.E., Savenkov, E.I., Solovyev, A.G., Morozov, S.Y. and Valkonen, J.P. (2002) Long-distance movement, virulence, and RNA silencing suppression controlled by a single protein in hordei- and potyviruses: complementary functions between virus families. *J. Virol.*, **76**, 12981-12991.
- Yoo, B.C., Kragler, F., Varkonyi-Gasic, E., Haywood, V., Archer-Evans, S., Lee, Y.M., Lough, T.J. and Lucas, W.J. (2004) A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell*, **16**, 1979-2000.
- 大島信行, 小餅昭二, 後藤忠則. (1965) 弱毒ワクチンによるウイルス病の防除 (1) トマトモザイク病の防除. 北海道農業試験場彙報 **85**, 23-33.
- 後藤忠則, 根本正康. (1971) 弱毒ウイルスによるウイルス病の防除 --安定弱毒ウイルスの

選出と各種植物に対する影響--. 北海道農業試験場彙報 **99**, 67-76.

細川大二郎, 渡辺実, 森寛一. (1989) 蛍光抗体法による植物ウイルスの増殖・分布の研究(V)
タバコモザイクウイルス感染タバコにおける葉の発達とウイルスの増殖・分布な
らびにモザイク症状の出現. 日本植物病理学会報, **55**, 187-193.

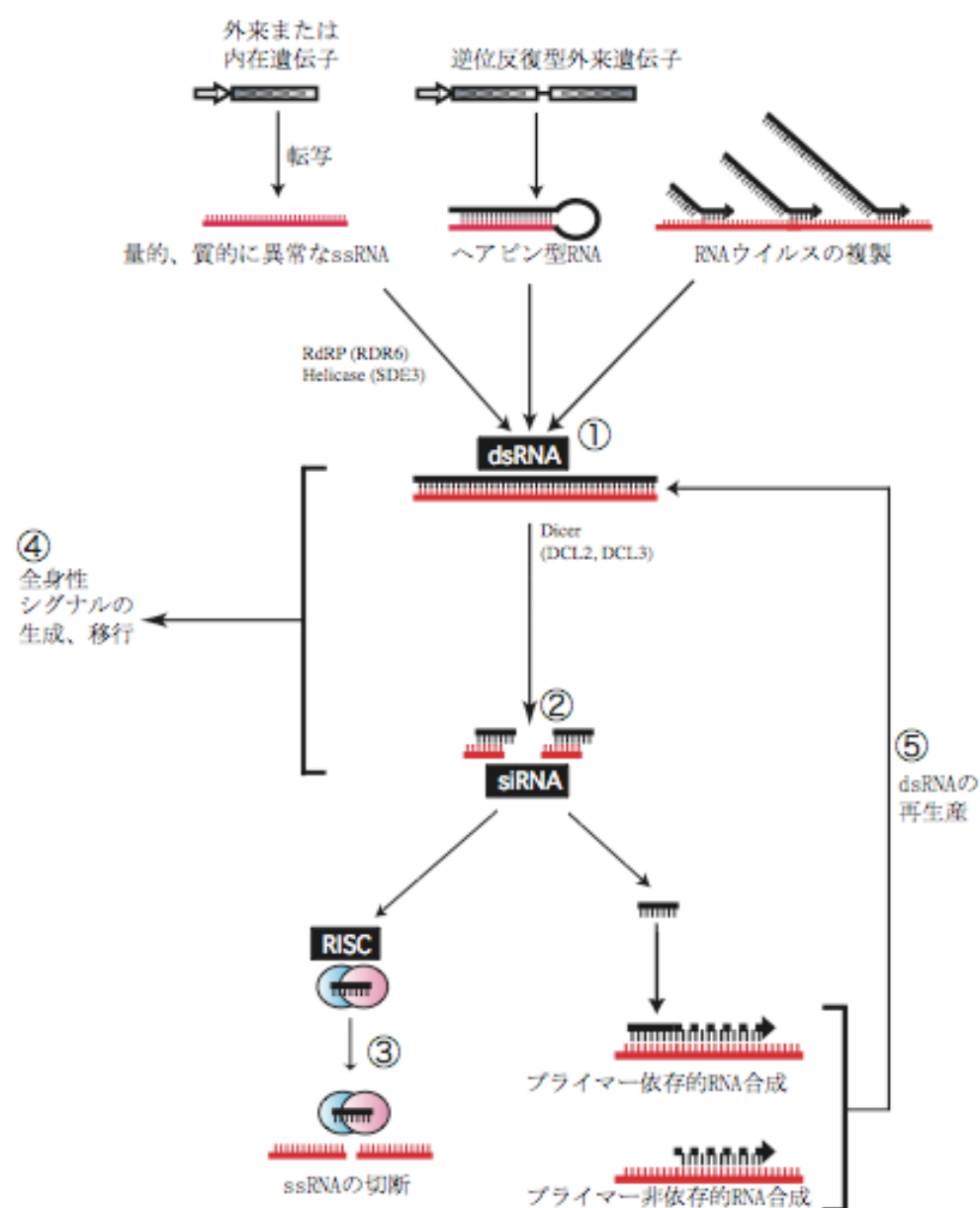


図1 PTGS反応の分子機構

- ① ssRNAを鋳型とした内在性RdRPによるRNA合成やヘアピン型RNA、RNAウイルスの複製などによりdsRNAが生成される。
- ② dsRNAはDicerによってsiRNAに切断される。
- ③ siRNAを取り込んだRISCが、siRNAと相補的な標的ssRNAを切断する。
- ④ 植物では全身性PTGSシグナルも生成される。
- ⑤ ssRNAは内在性RdRPにより再びdsRNAへと転換される？

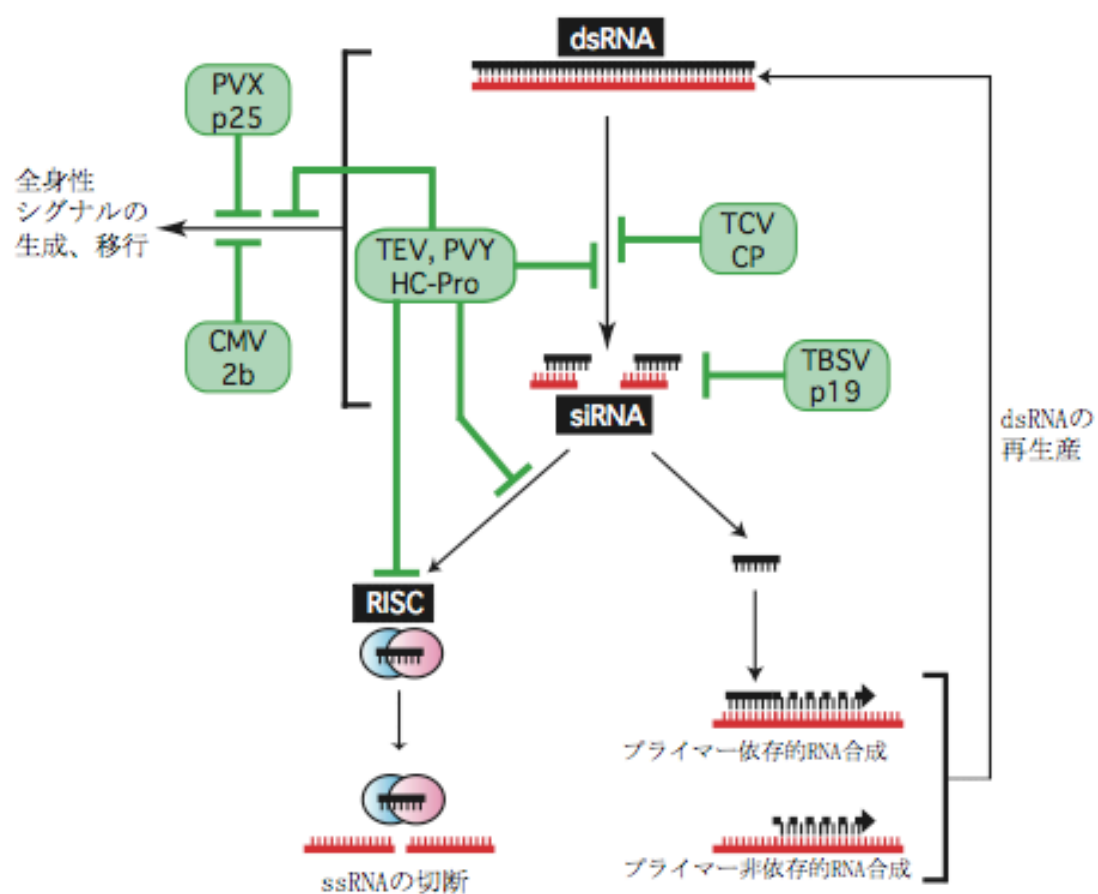


図2 既知のPTGSサプレッサーの作用点

既知のPTGSサプレッサーが阻害すると考えられているステップを緑色のバーで示した。詳細は第1章序論を参照。

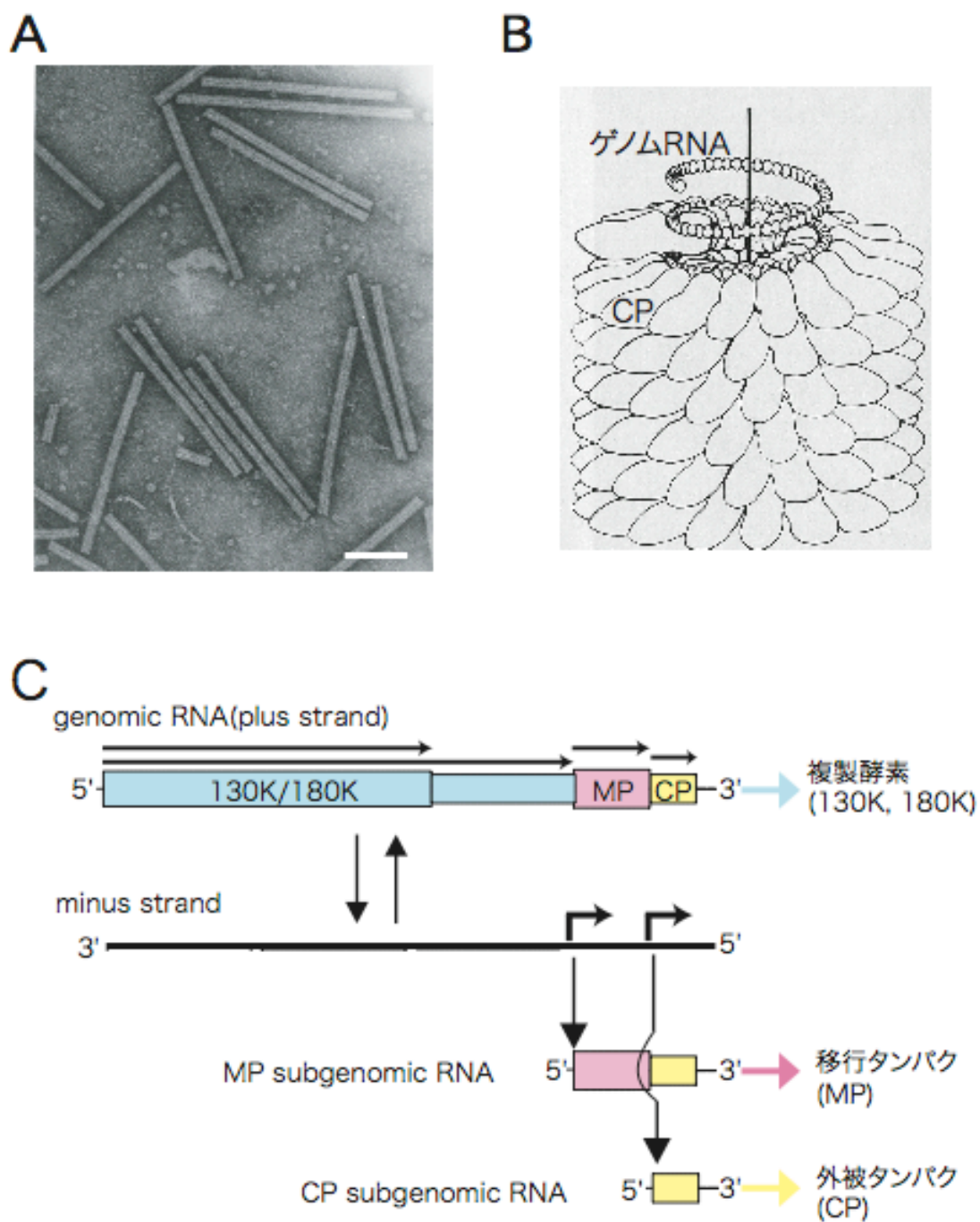


図3 TMVのウイルス粒子と複製様式

(A) TMV粒子の電子顕微鏡写真。スケールバーは100 μ m。

(B) TMV粒子構造の模式図。ゲノムRNAをCPが螺旋状につつむ。

(C) TMVの複製様式。ゲノムには4つの遺伝子がコードされている。複製酵素である130Kと180KはゲノムRNAから翻訳される。複製酵素はプラス鎖を鋳型としてマイナス鎖を合成し、マイナス鎖を鋳型にプラス鎖および2種のサブゲノムRNAを合成する。MPとCPがそれぞれのサブゲノムRNAから翻訳される。

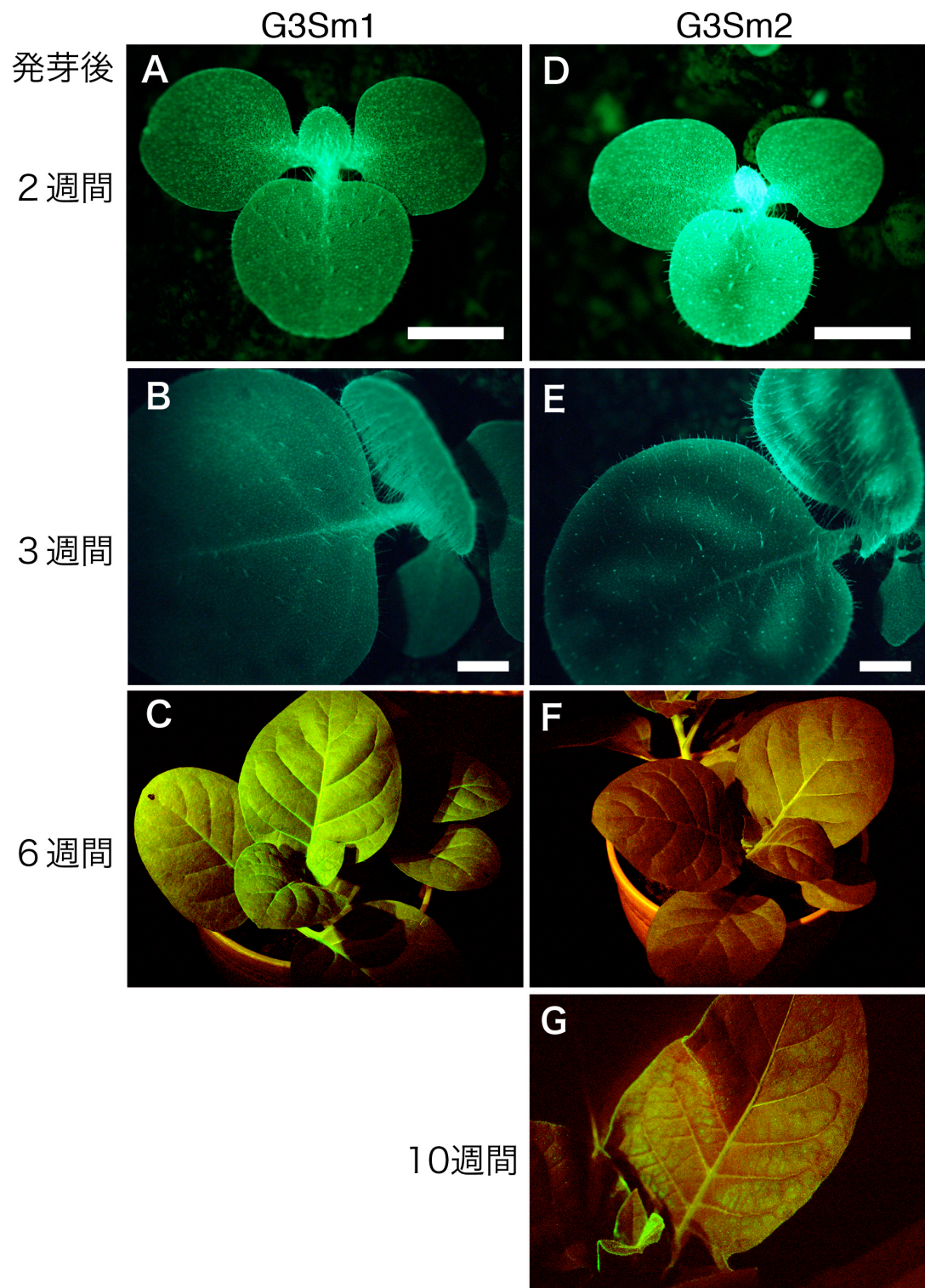


図4 発芽後 2、3、6 週間後のG3Sm1とG3Sm2のGFP蛍光像

G3Sm1 (A~C) は恒常的にGFPを発現する。G3Sm2 (D~F)は成長とともに葉脈に沿ってGFP蛍光を消失した。(G)はG3Sm2のうち、蛍光消失が遅れて展開葉でもGFP蛍光が残った個体。スケールバーは2 mm。

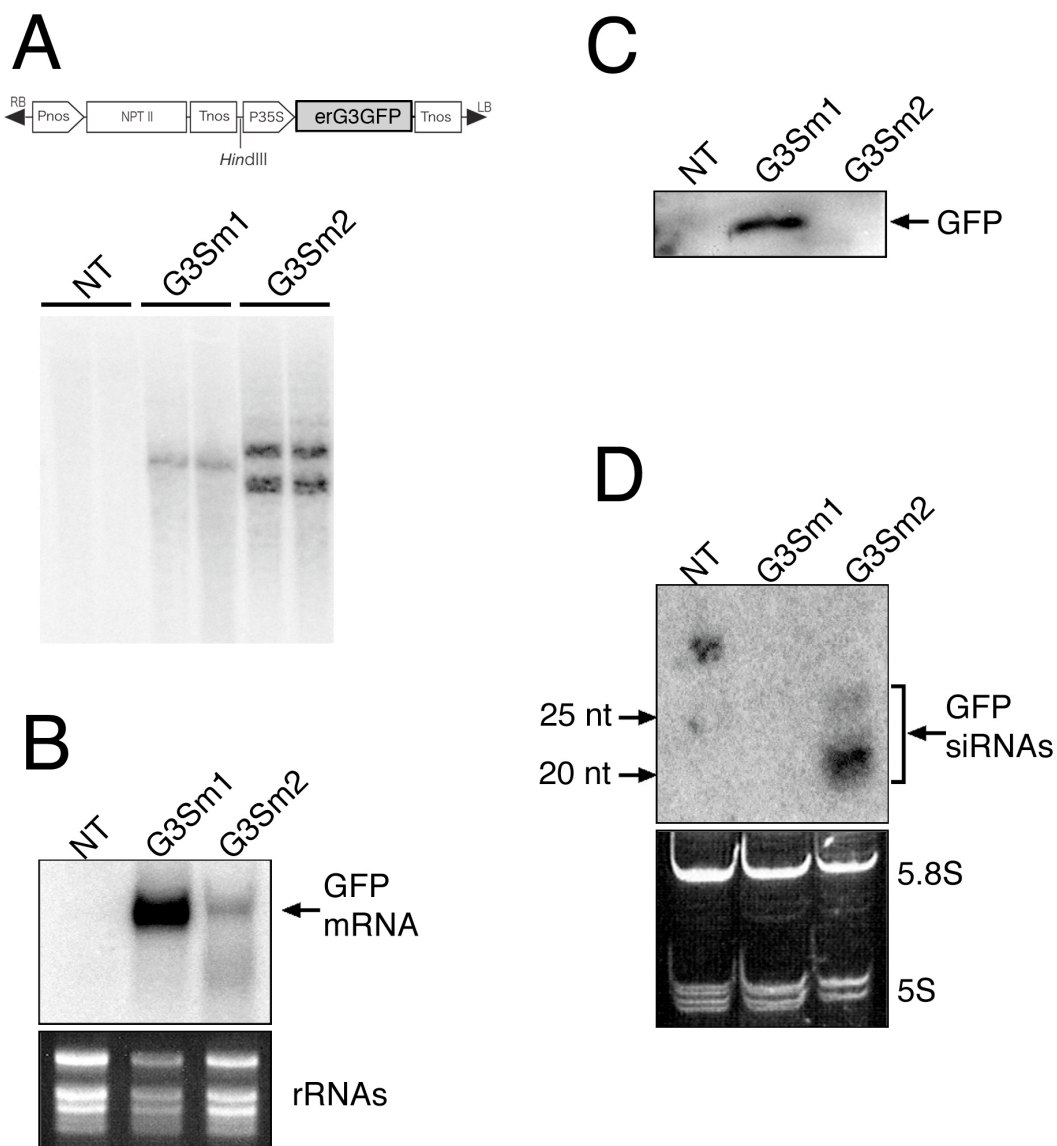


図5 GFP形質転換タバコの分子解析

(A) 上段；GFPの形質転換に用いたコンストラクト。*Hind*IIIサイトを1カ所もつ。下段；非形質転換体 (NT)、G3Sm1およびG3Sm2の各2個体から抽出したゲノムDNAを*Hind*III消化し、GFP ORF全長をプローブとしてサザンブロット解析した。G3Sm1では1本、G3Sm2では少なくとも3本のバンドが検出された。

(B) 展開葉のGFP mRNAをノーザンブロットにより解析。下段はrRNAのEtBr染色像。

(C) 展開葉のGFPをウエスタンブロットで解析。

(D) (B)で用いたRNAサンプルの低分子量を15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、ノーザンブロットでGFP siRNAを解析した。25 ntと20 ntのサイズマーカーの位置を左に示した。下段のパネルの5.8Sと5SはそれぞれのrRNAのバンドを表す。

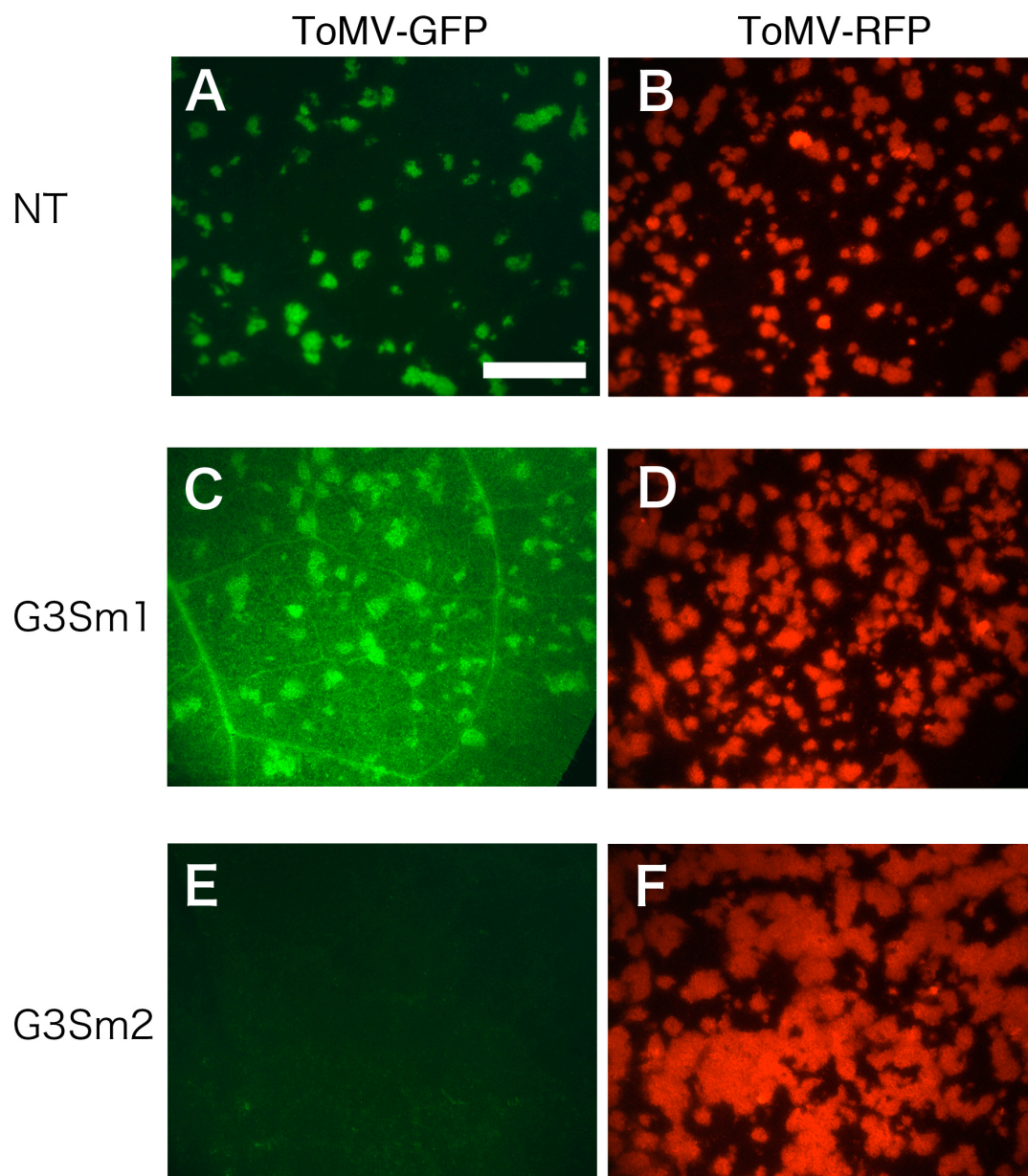


図6 G3Sm2はGFP配列をもつウイルスに抵抗性である

NT、G3Sm1またはG3Sm2タバコにToMV-GFPとToMV-RFP（図22）を混合接種した。2日後に接種葉のGFP蛍光とRFP蛍光を蛍光実体顕微鏡で観察した。G3Sm2ではGFP蛍光のスポットが見られなかった。スケールバーは4 mm。

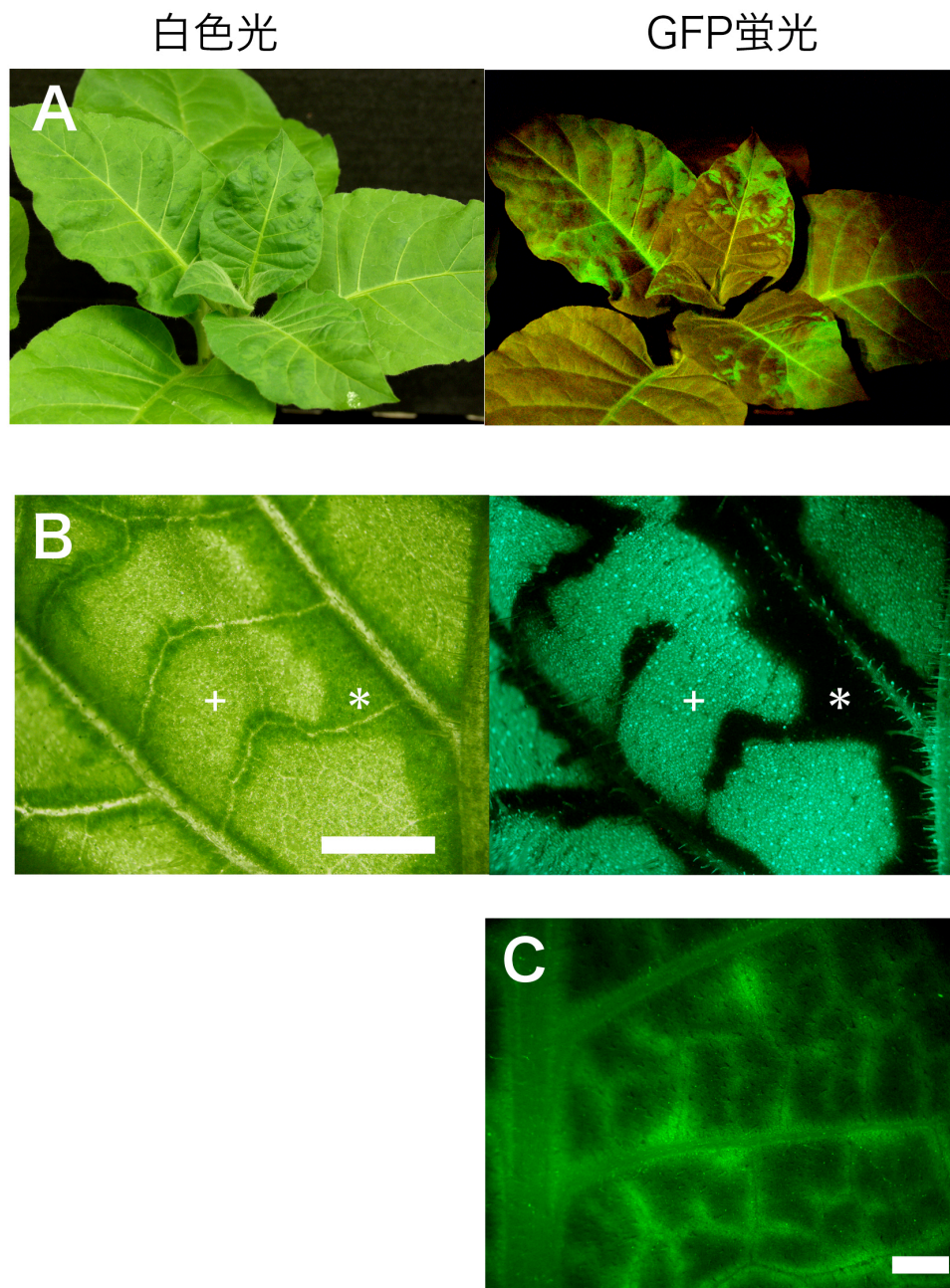


図7 ToMVが感染したG3Sm2にみられる病徴とGFP蛍光の復活
 (A) ToMV接種後11日のモザイク病徴 (左)と、同一視野のGFP蛍光像 (右)。
 (B) 接種後12日のモザイク葉の拡大図。モザイクの模様と完全に一致した形でGFP蛍光が復活した。+はyellow tissueを、*はdark green tissueを示す。
 (C) 葉脈透化症状が生じたL3葉で見られたGFP蛍光。
 スケールバーは2 mm。

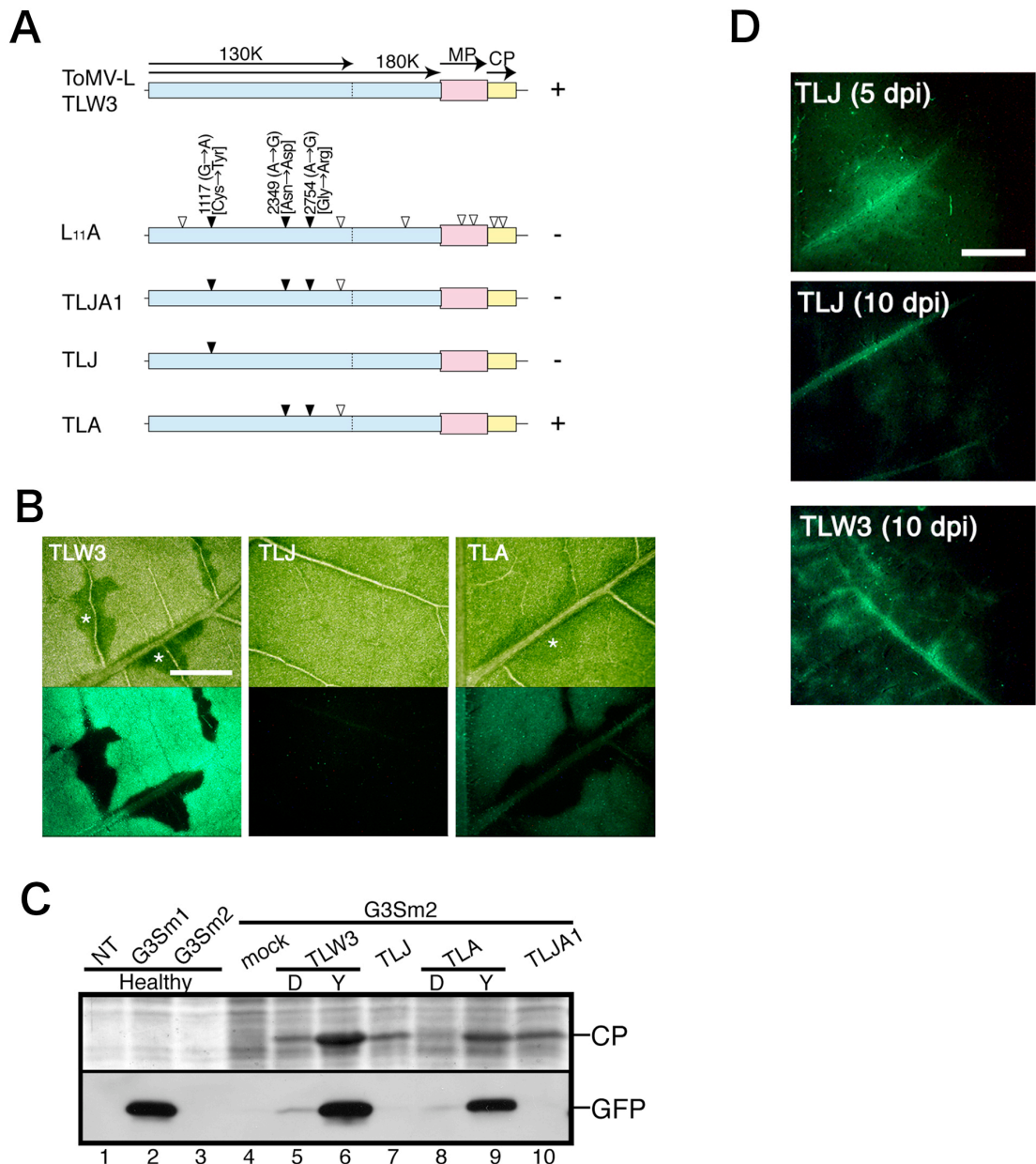


図8 PTGS抑制能の欠損に關与するToMVの変異

(A) ToMVのゲノム構造。野生型株であるToMV-L (TLW3)と比較して、ToMV弱毒株 L₁₁Aとそれに由来する組換えウイルスの塩基置換変異を三角印で示した。黒三角はアミノ酸置換を伴う変異を示す。病徴とPTGS抑制能の有無を+と一印で示した。

(B) TLW3、TLJまたはTLAのトランスクリプトを接種したG3Sm2のモザイク相当葉 (L5)の病徴 (上段)とGFP蛍光 (下段)。アスタリスクはDark Green Tissueを示す。スケールバー4 mm。

(C) モザイク相当葉 (L5)からタンパクを抽出しSDS-PAGE後、CBB染色によりウイルスCP (上段)を、ウェスタンブロットによりGFP (下段)を検出。レーン1～3は健全植物の第5本葉。レーン4～10はモック (レーン4)、TLW3 (レーン5、6)、TLJ (レーン7)、TLA (レーン8、9)、TLJA1 (レーン10)を接種したG3Sm2のモザイク相当葉 (L5)。TLW3とTLAはDGT (D)とYT (Y)を別々にサンプリングした。

(D) TLJまたはTLW3を小さな葉 (葉長2～3cm) に接種したときに復活してくるGFP蛍光。TLJでは蛍光は10 dpiで消失したが、TLW3では消失しなかった。スケールバーは4 mm。

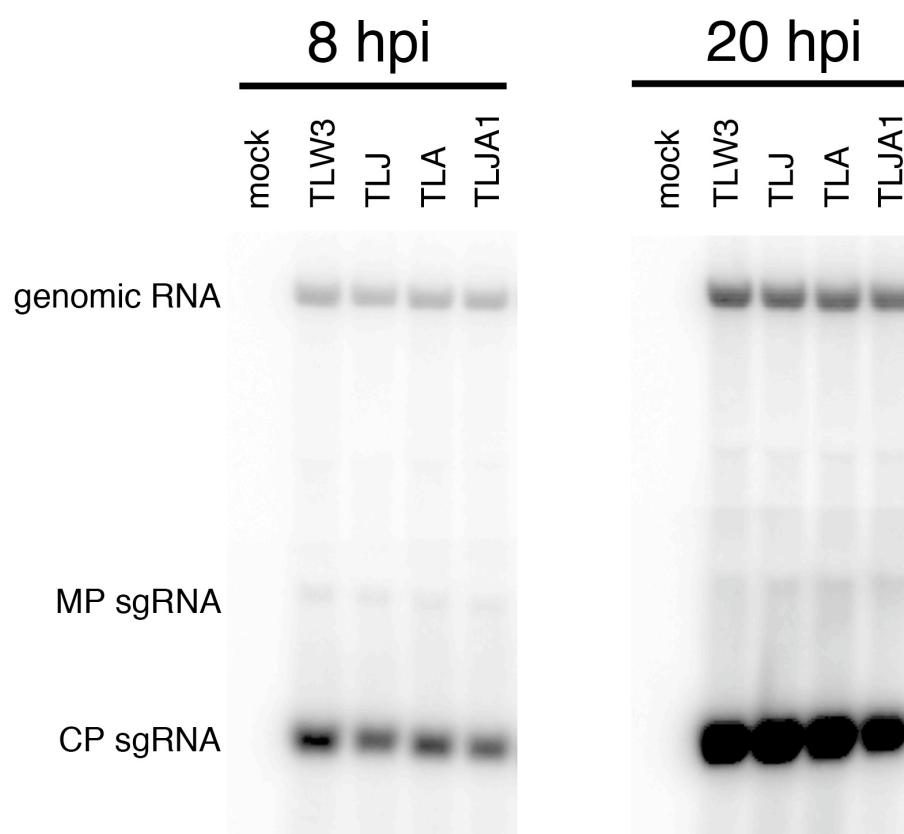


図9 プロトプラストにおけるToMV変異株の増殖

BY2培養細胞のプロトプラストにmockまたはTLW3、TLJ、TLA、TLJA1の感染性トランスクリプトをエレクトロポレーションにより接種した。8または20時間培養してRNAを回収し、ノーザンブロットでToMVプラス鎖を検出した。ゲノムおよび2本のサブゲノムRNAのバンドの位置を左に示す。

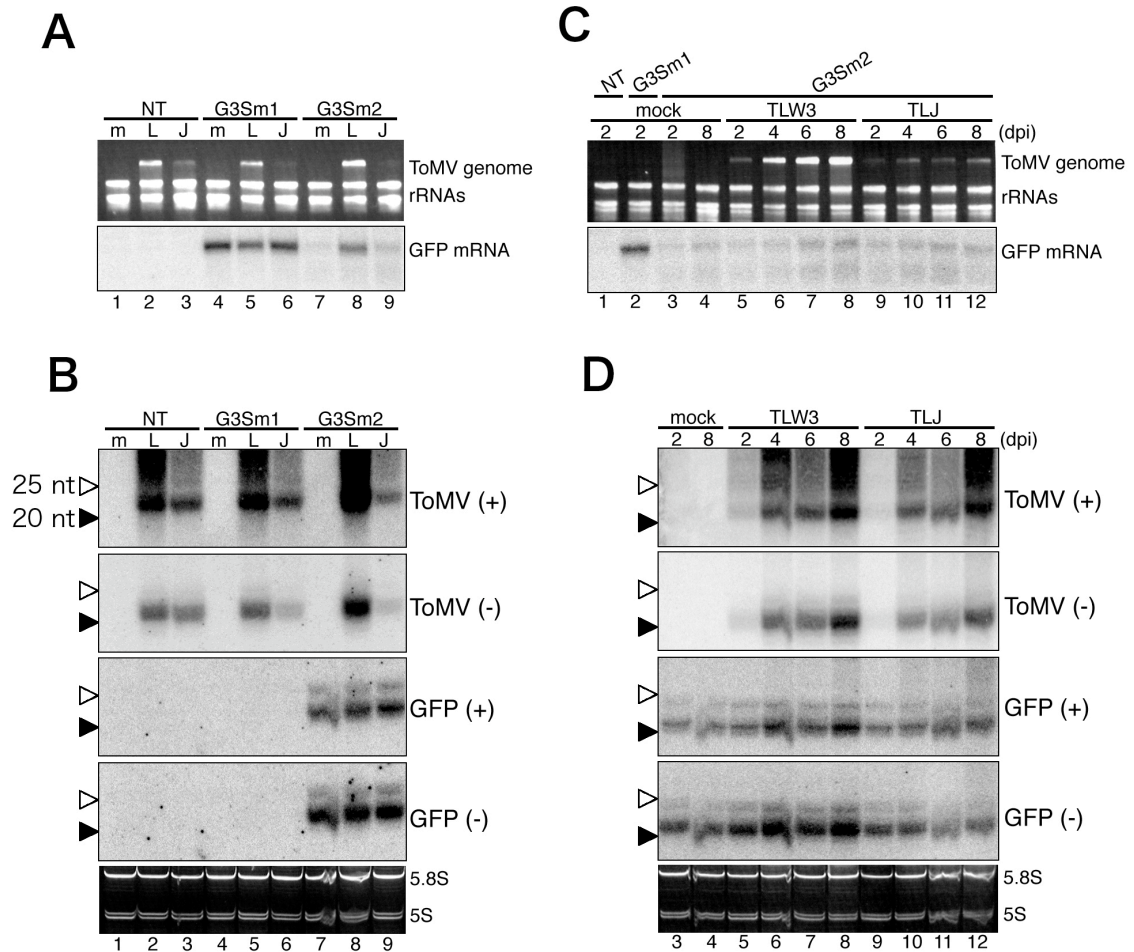


図10 ToMV感染タバコの上位葉と接種葉におけるRNA解析

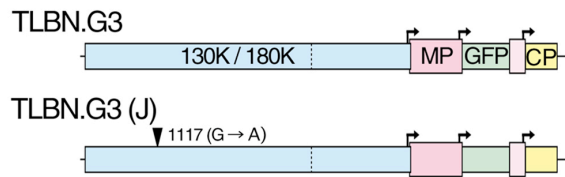
(A) NT、G3Sm1またはG3Sm2タバコにそれぞれmock (レーン m)、TLW3 (レーン L)、TLJ (レーン J)を接種し、28°Cで育てた。12 dpiの感染上位葉 (L6とL7) からトータルRNAを抽出してアガロースゲル電気泳動し、EtBr染色でToMVゲノムRNA (上段)を、ノーザンブロットでGFP mRNA (下段)を検出した。RNA量は吸光度でそろえた。

(B) パネル Aで用いたRNAの低分子量画分を15%-ポリアクリルアミド電気泳動で分離し、ノーザンブロットでToMVとGFP配列をもつsiRNAを検出した。1枚のメンブレンでプローブのハイブリダイゼーションとストリップを繰り返した。25 ntと20 ntのRNAマーカーの位置を白三角と黒三角で示す。(+)と(-)はそれぞれプラス鎖 (センス鎖) とマイナス鎖 (アンチセンス鎖)を検出したことを示す。ゲルをEtBr染色して5.8Sおよび5S rRNAをローディングコントロールとした (最下段)。

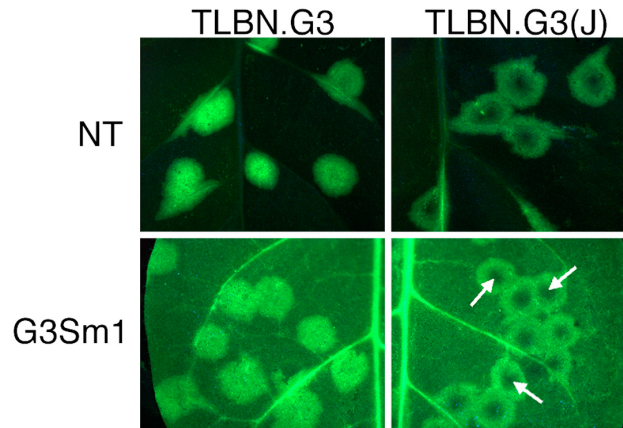
(C) G3Sm2接種葉でのToMVとGFP mRNAの蓄積。mock、TLW3またはTLJの接種葉から、2、4、6、8 dpiでトータルRNAを抽出し、パネルAと同様に解析した。ただしRNA量はrRNAのバンドの濃さでそろえた。

(D) パネルCで用いたRNAの低分子量画分を、パネルBと同様に解析した。

A



B



C

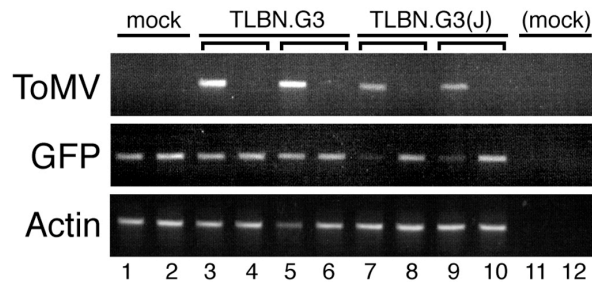


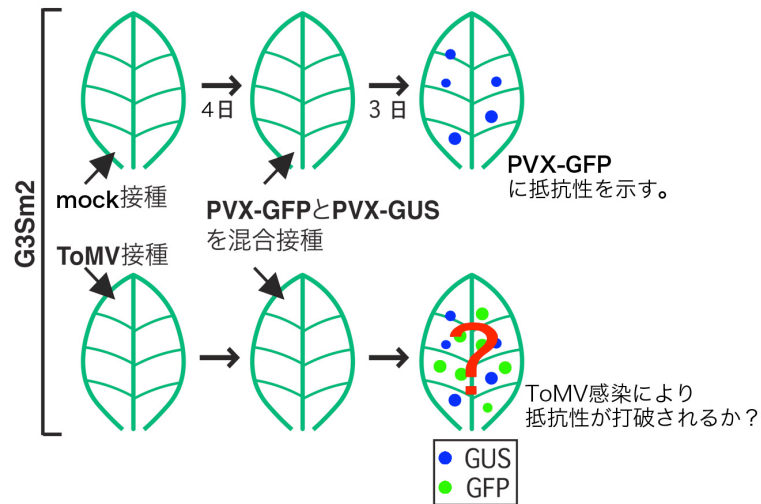
図11 接種葉におけるウイルスを標的とするPTGSの抑制

(A) GFPをコードする組換えToMVのゲノム構造。矢印はサブゲノムRNAの転写開始点を示す。

(B) NTタバコとG3Sm1タバコにTLBN.G3を接種したときのGFP蛍光スポット。矢印はトランスジーン由来のGFPの発現が抑制されて穴があいたように見える部位を示す。接種後28℃で栽培し6 dpiで撮影した。

(C) TLBN.G3(J)のGFPスポット中心部でのGFP mRNAの減少。TLBN.G3接種葉 (レーン3～6) とTLBN.G3(J)接種葉 (レーン7～10) の蛍光スポットの中心部 (レーン3, 5, 7, 9) と蛍光スポット以外の部分 (レーン4, 6, 8, 10)、またはモック接種葉 (レーン1, 2, 11, 12)からRNAを抽出し、RT-PCRを行なった。パネルの上段の括弧は同一の葉からのサンプルであることを示す。レーン11, 12はレーン1, 2と同一のRNAサンプルを用い、プライマーなしに逆転写反応をしたcDNAをテンプレートとしてPCRを行なった。アクチンcDNAの増幅はコントロール実験として行なった。

A



B

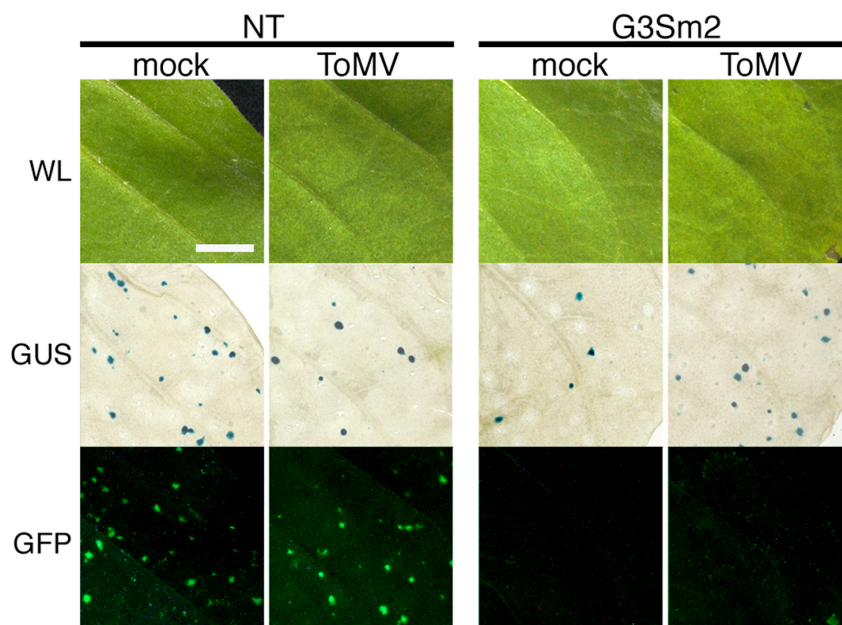


図12 ToMVは一度成立したPTGSを抑制しない

(A) 実験の手順。G3Sm2はPTGSにより、GFP配列をもつPVXに対して抵抗性である（上）。ToMVがG3Sm2で成立したPTGSを抑制できるならば、G3Sm2のPVX-GFPに対する抵抗性は打破されることが予想される（下）。

(B) NTタバコとG3Sm2タバコにモックまたはToMVを接種し、4日後にPVX-GFPとPVX-GUSを混合接種した。さらに3日後、同一部位の白色光像 (WL)、GUS染色像(GUS)およびGFP蛍光像 (GFP)を撮影した。スケールバーは1 cm。

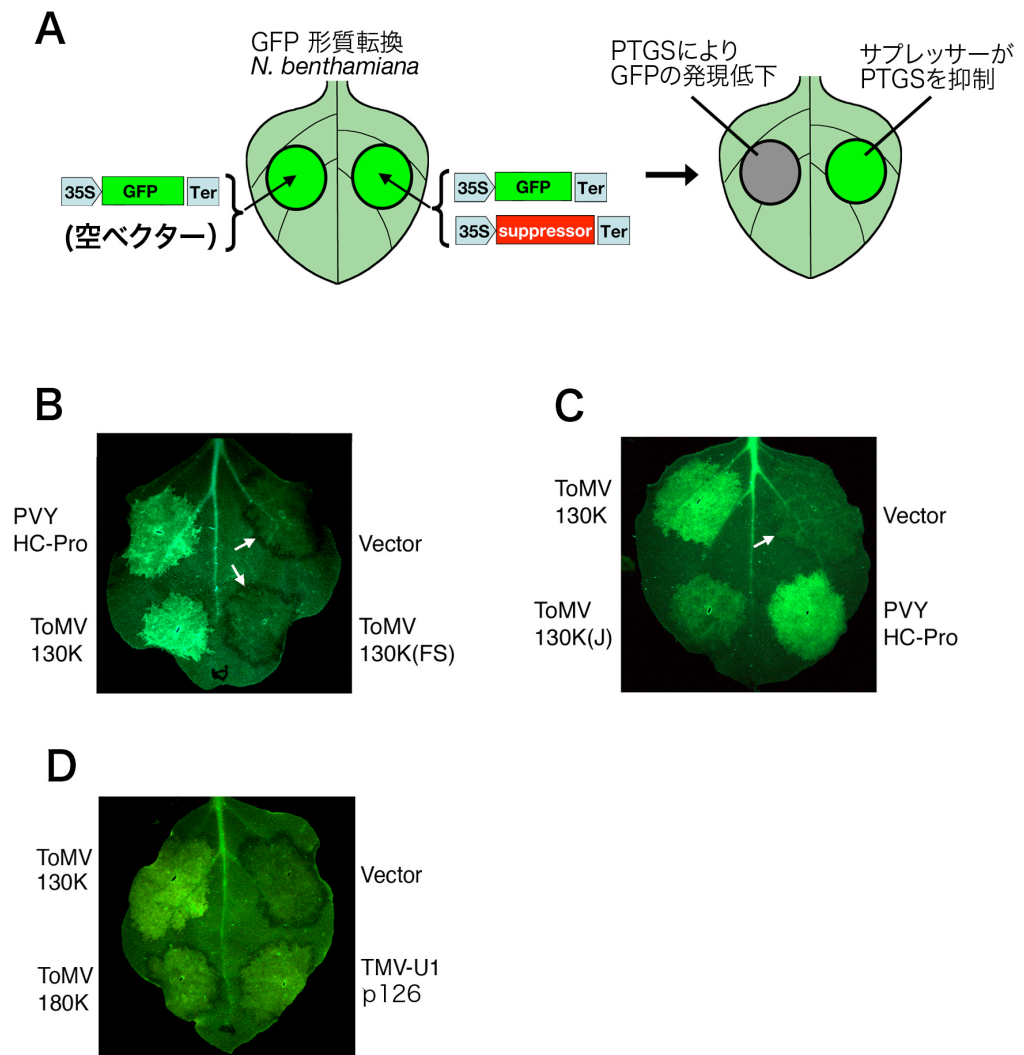


図13 ToMV 130Kは単独でPTGSを抑制できる

(A) アグロインフィルトレーション実験の仕組み。35S/GFPコンストラクトと空ベクターのコンストラクトを保持したアグロバクテリウム懸濁液をGFP形質転換*N. benthamiana* (G3Nb3)に導入すると、PTGSによりGFPの発現低下が起こる。サプレッサー遺伝子とともに導入した場合には、PTGSが抑制され、GFPの発現が持続する。

(B~D) インフィルトレーションした葉のGFP蛍光像。PVYのHC-Pro、ToMVの複製酵素である130K (130K)、130Kのフレームシフト変異体である130K (FS)、TLJの130Kである130K(J)、ToMV 130Kのリードスルー産物である180K、TMV-U1の複製酵素であるp126 (TMV-U1 p126)、またはのコンストラクトをアグロインフィルトレーションにより導入した。Vectorは空ベクターを導入したことを示す。矢印は注入部位の周辺でGFP蛍光が減少した領域を示す (B) はインフィルトレーション後22°Cに5日間置いた。

(C) はインフィルトレーション後22°Cに1日置いた後、28°Cに3日置いた。(D) はToMV 180KとTMV 126Kのサプレッサー活性。

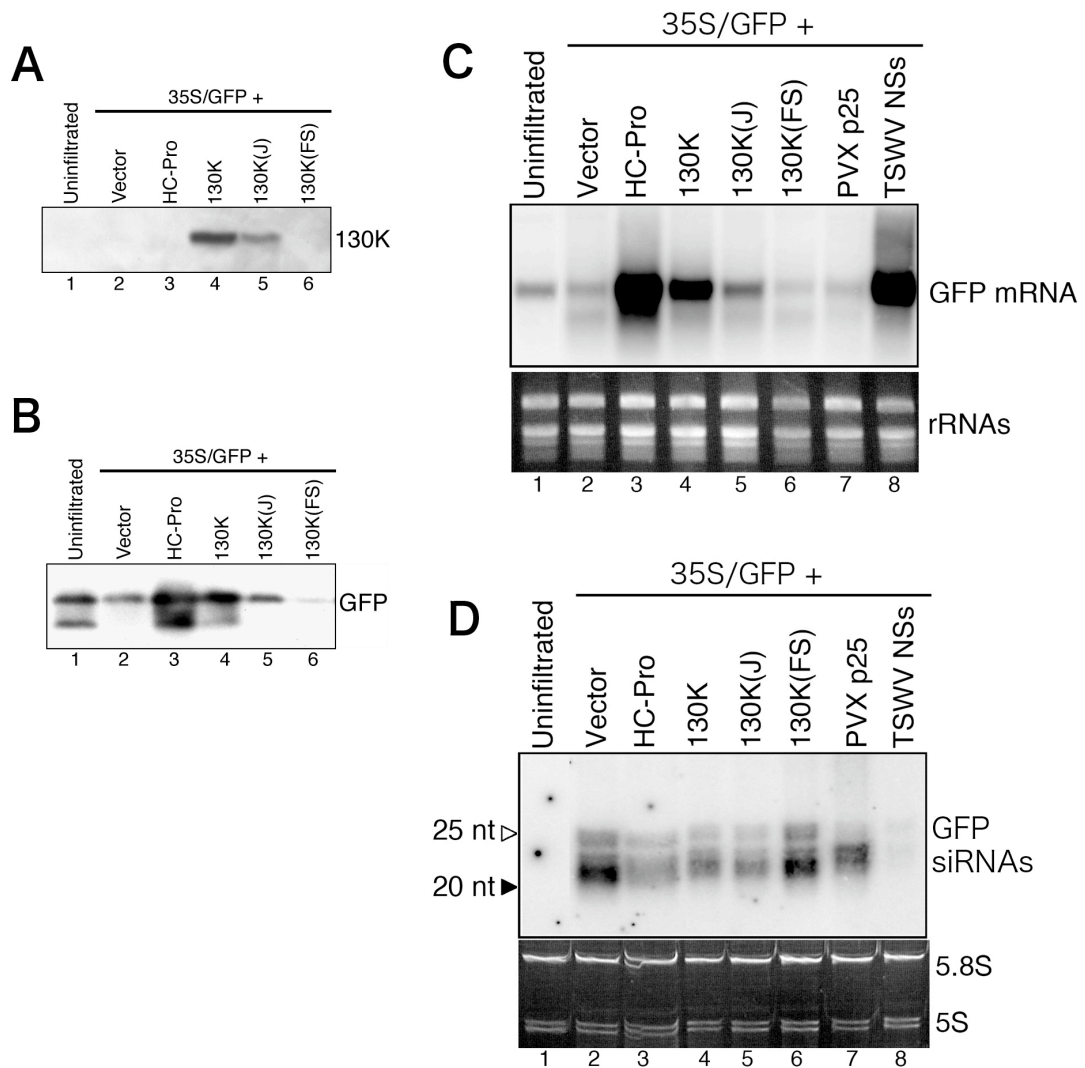


図14 アグロインフィルトレーションした組織のタンパクおよびRNA解析

図13で示したアグロインフィルトレーションした組織および注入していない組織 (Uninfiltrated) からタンパクおよびRNAを抽出し、ウエスタンブロットおよびノーザンブロット解析した。

(A) 130Kタンパクの発現。インフィルトレーション後22°Cに2日置いた植物体を用いた。

(B) ウエスタンブロットによるGFPの検出。インフィルトレーション後22°Cで1日、28°Cで3日置いた植物体のサンプルを用いた。

(C) GFP mRNAの蓄積をノーザンブロットにより検出した。インフィルトレーション後22°Cで1日、28°Cで2日置いた植物体。下段はEtBr染色によりrRNAを検出した。コントロールとしてサプレッサーであるPVX p25とTSWV NSsを加えた (レーン7、8)。

(D) パネルCと同じRNAサンプルに由来する低分子量RNAを用い、GFP siRNAをノーザンブロットにより検出した。左に20 nt および25 ntのRNAサイズマーカーの位置を示す。下段はブロッティング前のゲルのEtBr染色像。

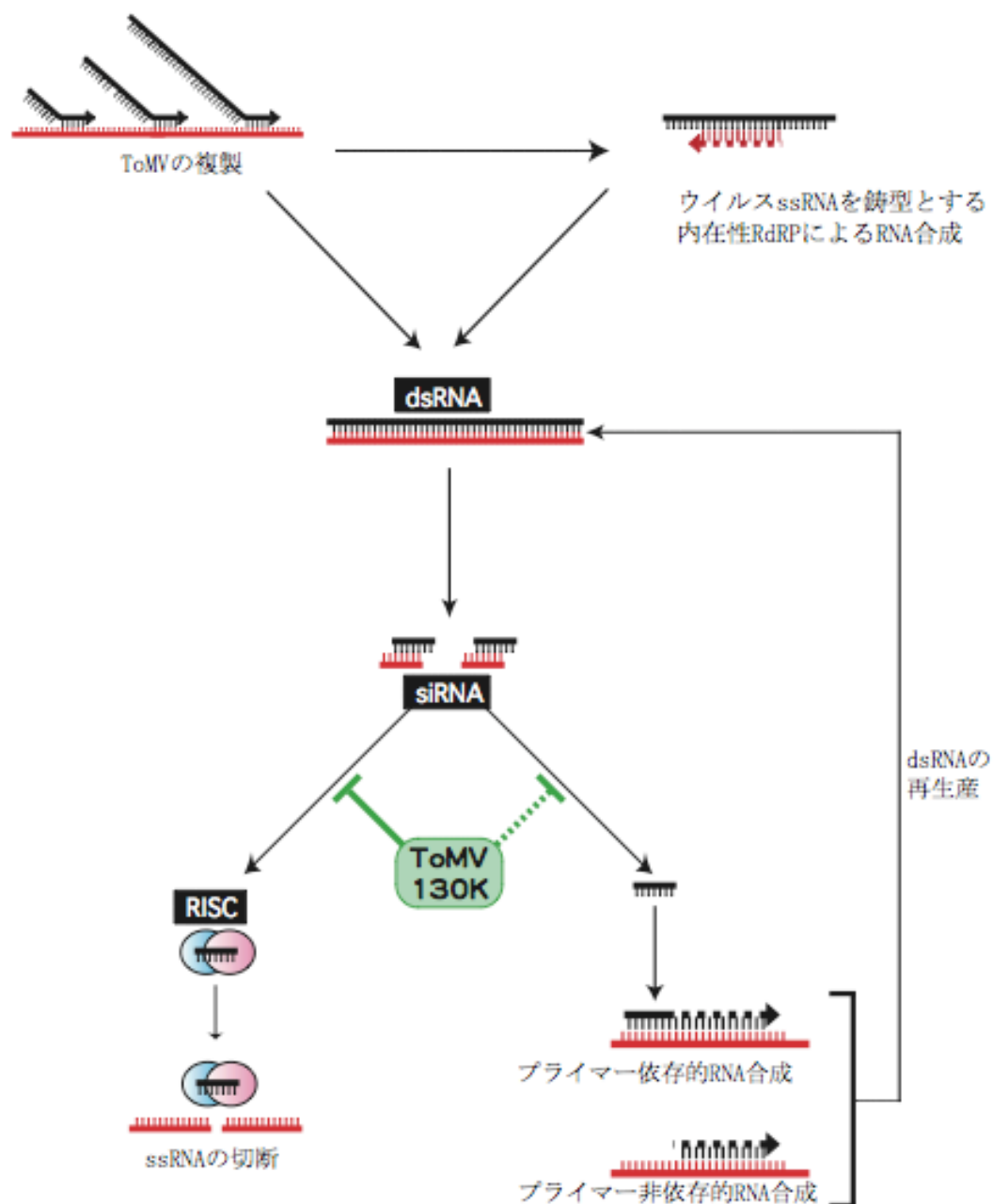
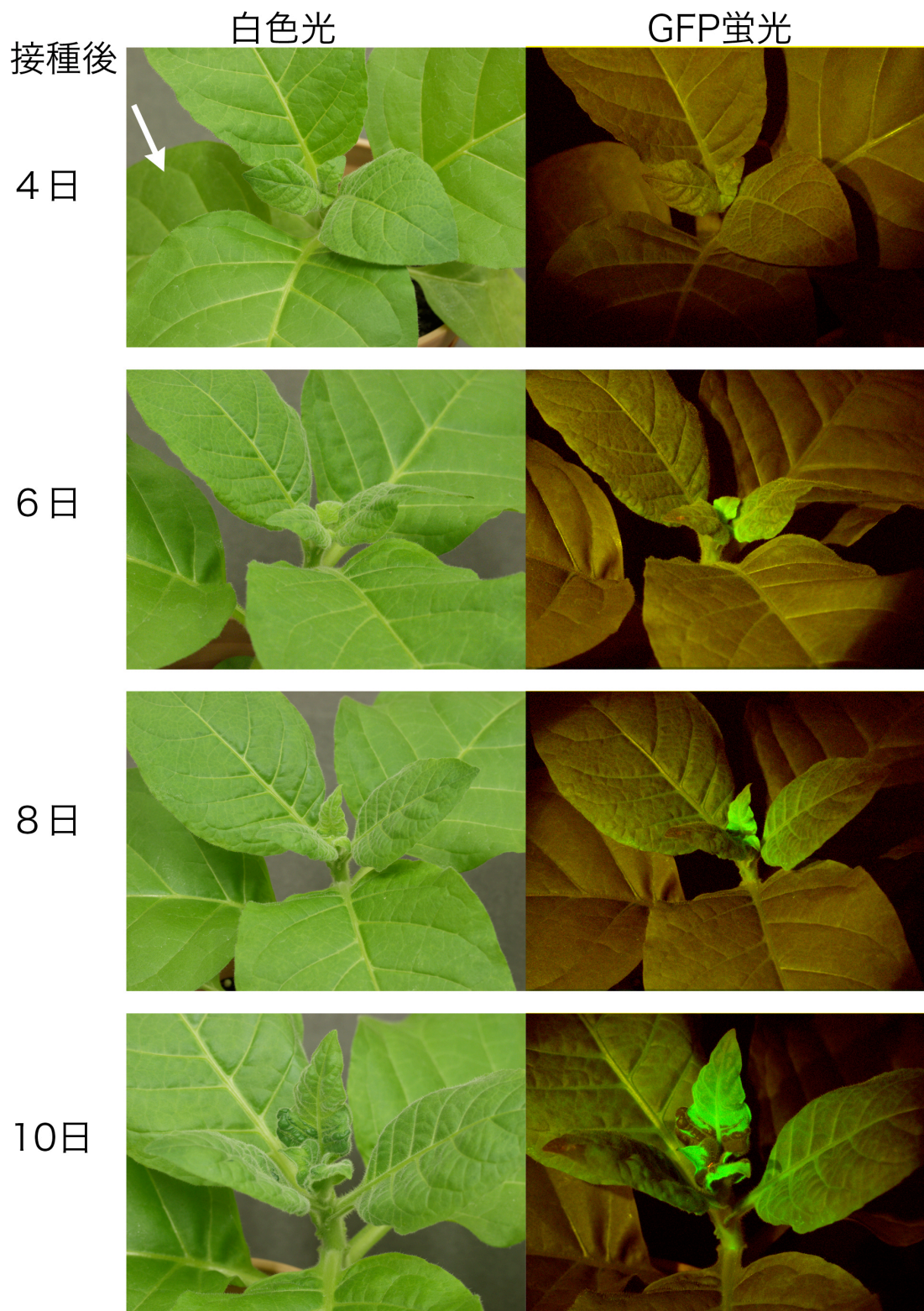
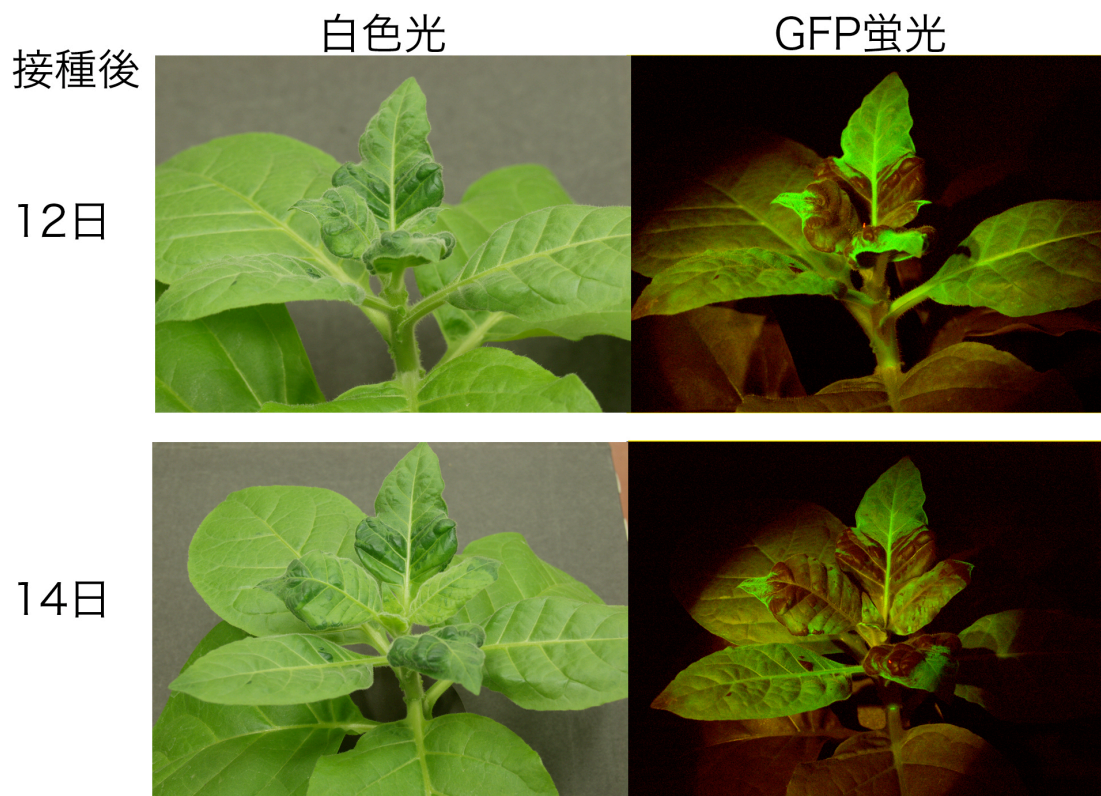


図15 PTGS反応系における130Kの作用点

ToMV 130KはsiRNAの利用を妨げることにより、新規RISC形成を阻害する。あるいはRdRPによるdsRNAの再生産も間接的に阻害するかもしれない。詳しくは第1章考察を参照。



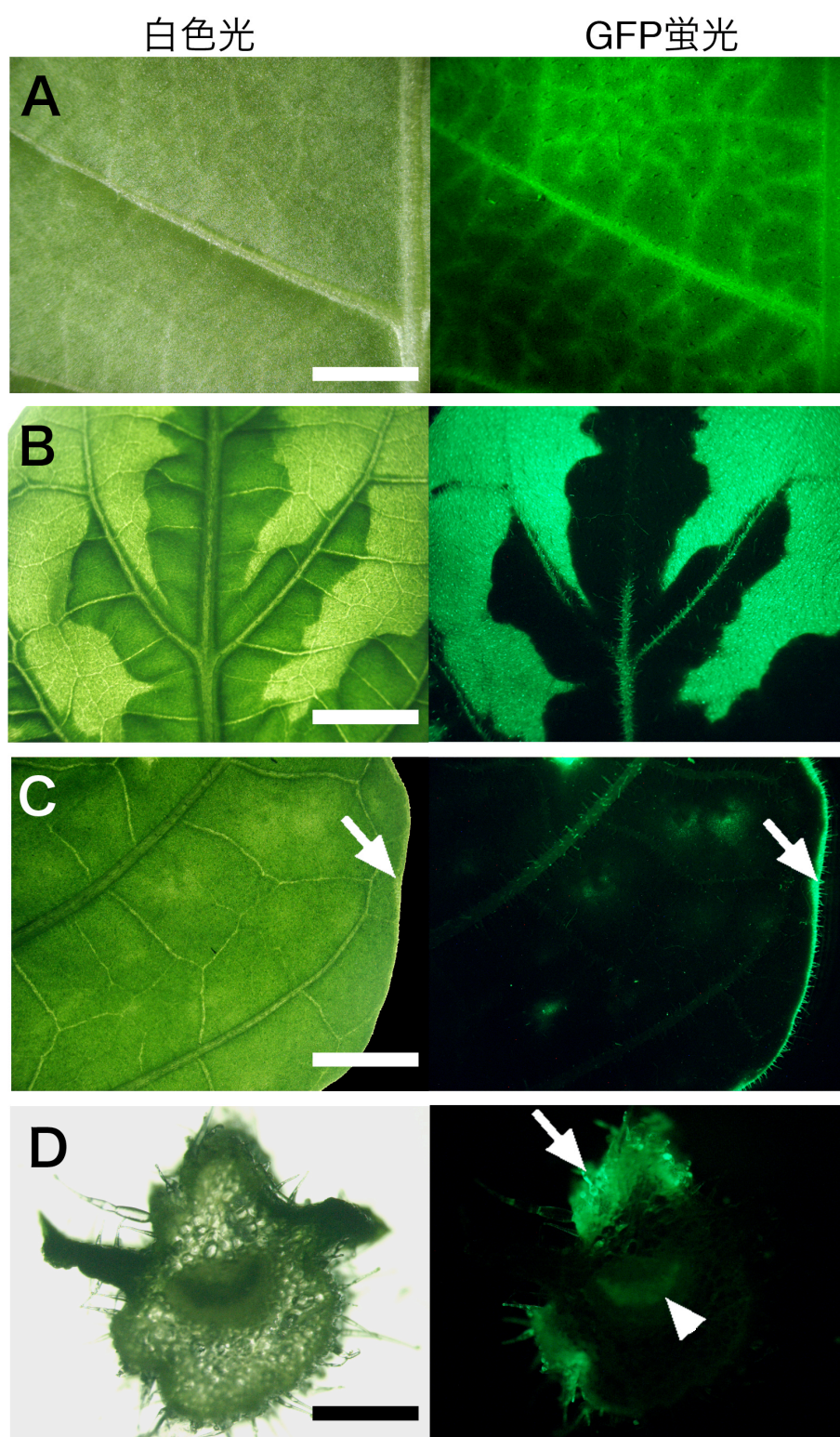
(次頁へつづく)



(前頁よりつづく)

図16 TMV-OMがG3Sm2に引き起こすモザイク病とGFP蛍光の復活

矢印で示した葉 (L0) にTMV-OMを接種し、病徴とGFP蛍光を経時観察した。



(次頁につづく)

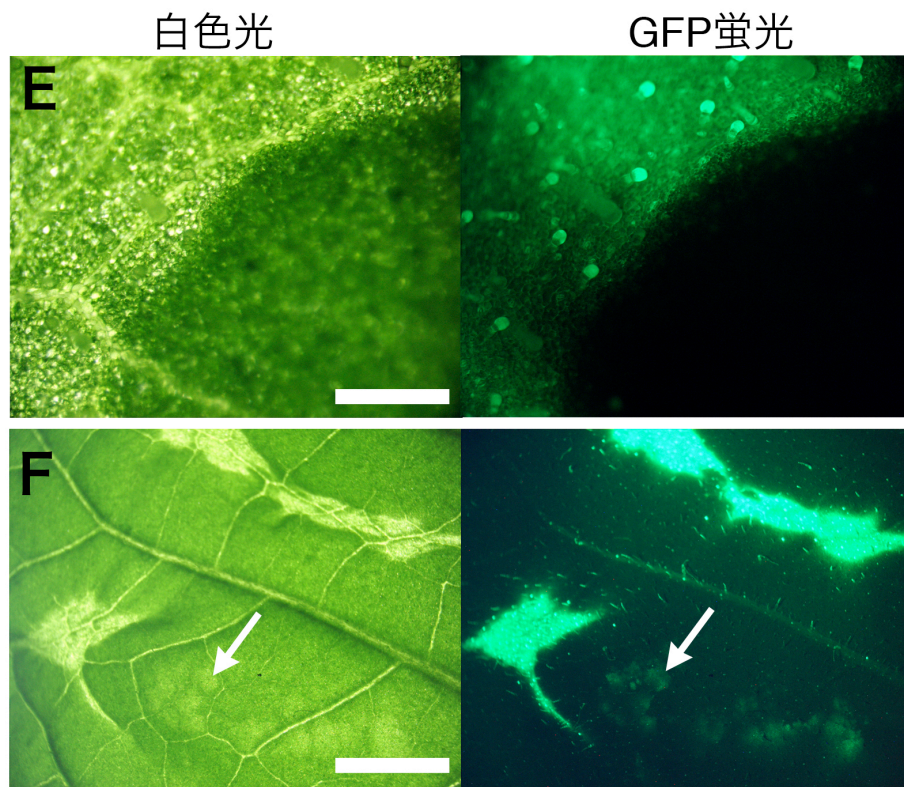


図17 TMVが感染したG3Sm2における病徴とGFP蛍光復活の詳細
 (A) 6 dpiのL3に現れた葉脈透化症状（左）に一致して復活したGFP蛍光。
 (B) 14 dpiのモザイク葉の拡大図。
 (C) 19 dpiのモザイク葉のDGT領域を縁どるように現れたYT(左、矢印) とGFP
 蛍光。
 (D) 19 dpiのモザイク葉の主葉脈の横断面。矢印はGFP蛍光、矢尻は自家蛍光を
 示す。
 (E) 19 dpiのモザイク葉の、DGTとYTの境界部。
 (F) 19 dpiのモザイク葉で生じたpseudo DGT（矢印）における弱いGFP蛍光の
 復活。
 スケールバーはパネルA, B, C, Fは4 mm、パネルDは0.6 mm、パネルEは0.4
 mm。

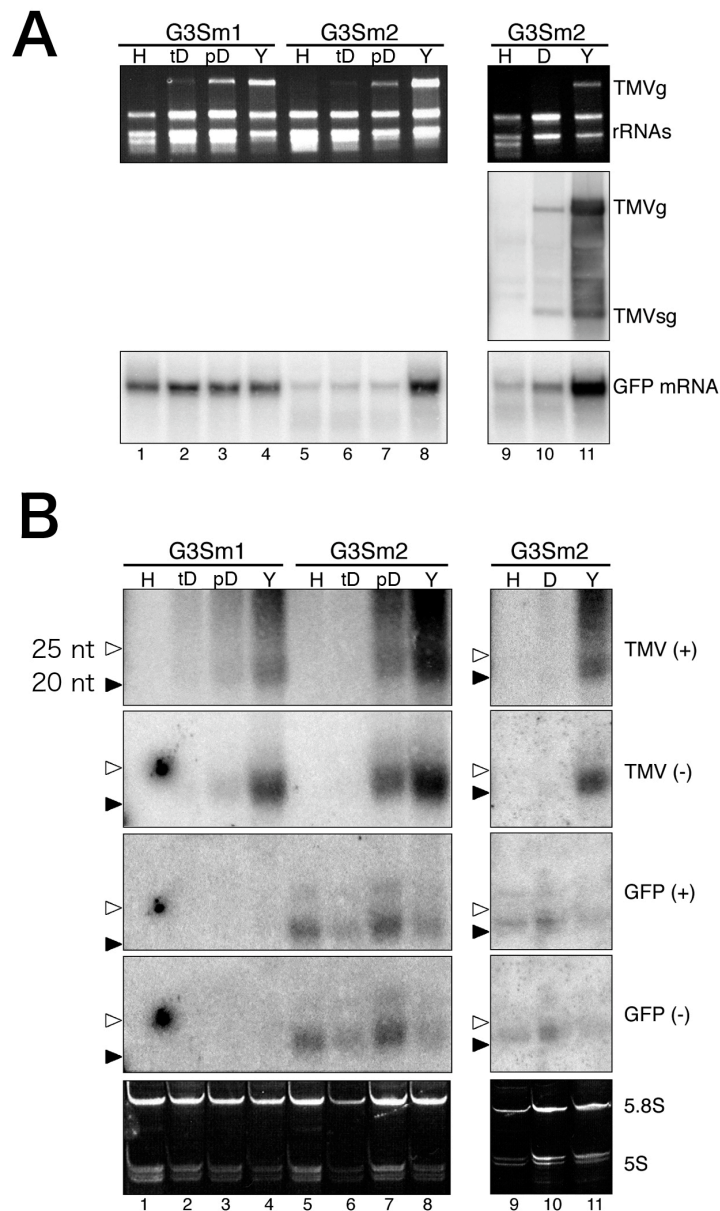


図18 TMV感染タバコモザイク葉におけるRNA解析

(A) G3Sm1またはG3Sm2にTMV-OMを接種し、26°Cで育てた。健全植物 (H) とモザイク葉のtrue DGT (tD)、pseudo DGT (pD)、Yellow Tissue (Y)から全RNAを抽出した。アガロースゲル電気泳動し、EtBr染色でTMVゲノムRNA (上段) を、ノーザンブロットでGFP mRNA (下段) を検出した。また、pseudo DGTが現れていない早い時期のモザイク葉をDGT (D)とYT (Y)に分け、同様に解析した (レーン9~11)。TMV RNAをノーザンブロットで検出した (中段)。

(B) パネル Aで用いたRNAの低分子量画分をPAGEで分離し、ノーザンブロットでTMVとGFP配列をもつsiRNAを検出した。1枚のメンブレンでプローブのハイブリダイゼーションとストリプを繰り返した。25 ntと20 ntのDNAマーカーの位置を白三角と黒三角で示す。(+)と(-)はそれぞれプラス鎖 (センス鎖) とマイナス鎖 (アンチセンス鎖) を検出したことを示す。ゲルをEtBr染色して5.8Sおよび5S rRNAをローディングコントロールとした (最下段)。

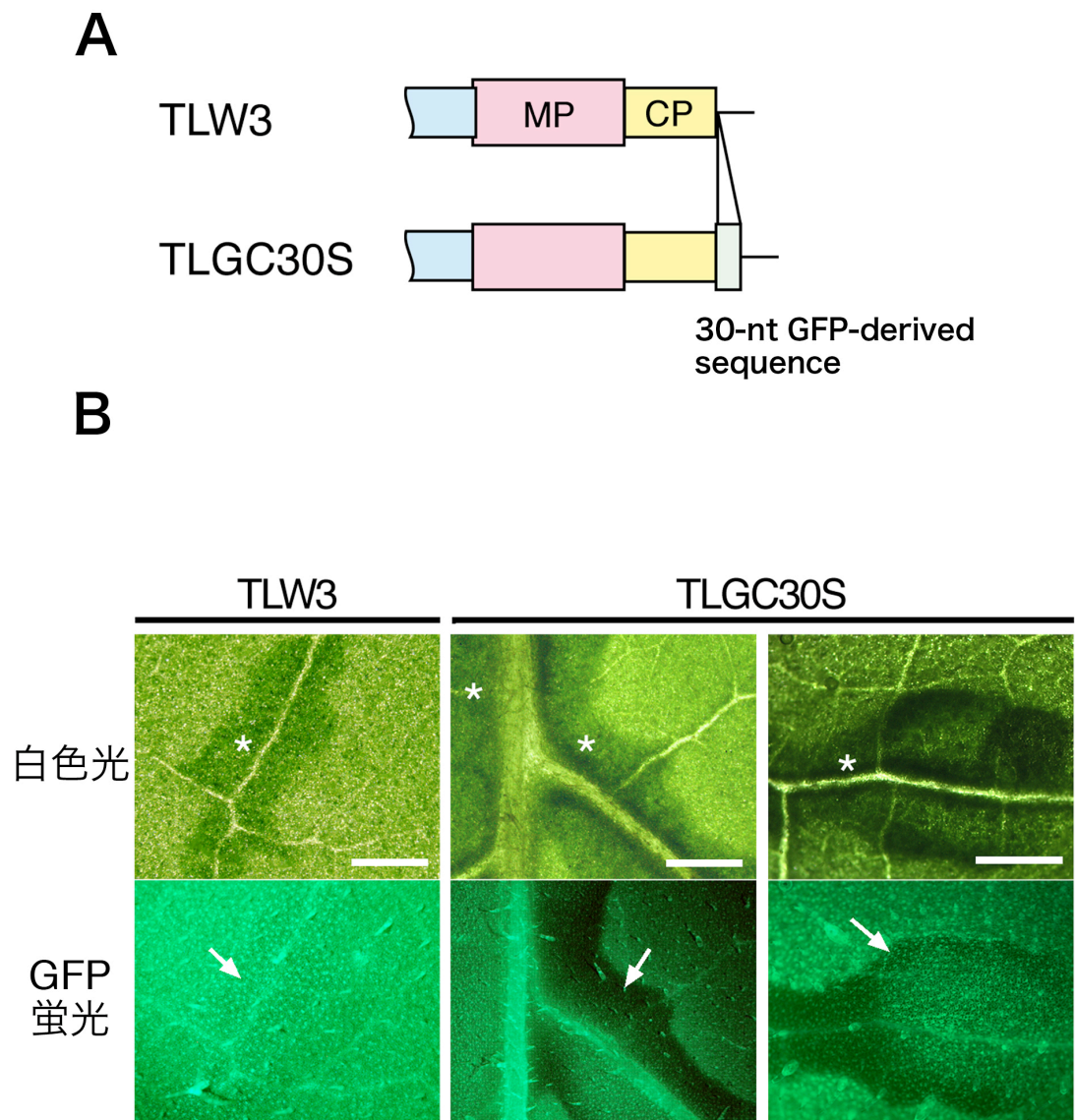


図19 G3Sm1のモザイク葉で観察されたGFPのサイレンシング

(A) 野生型ToMVであるTLW3と、GFP遺伝子に由来する配列が30nt挿入されたToMVであるTLGC30Sのゲノム構造。

(B) TLW3 (左) またはTLGC30S (中と右) を接種したG3Sm1のモザイク葉のGFP蛍光。アスタリスクはDGTを示し、矢印はYTに隣接したDGT領域を示す。TLGC30SのモザイクではGFP蛍光が低下した。TLW3を接種したG3Sm1のモザイク葉では、蛍光消失はほとんど起きなかった。スケールバーは1 mm。

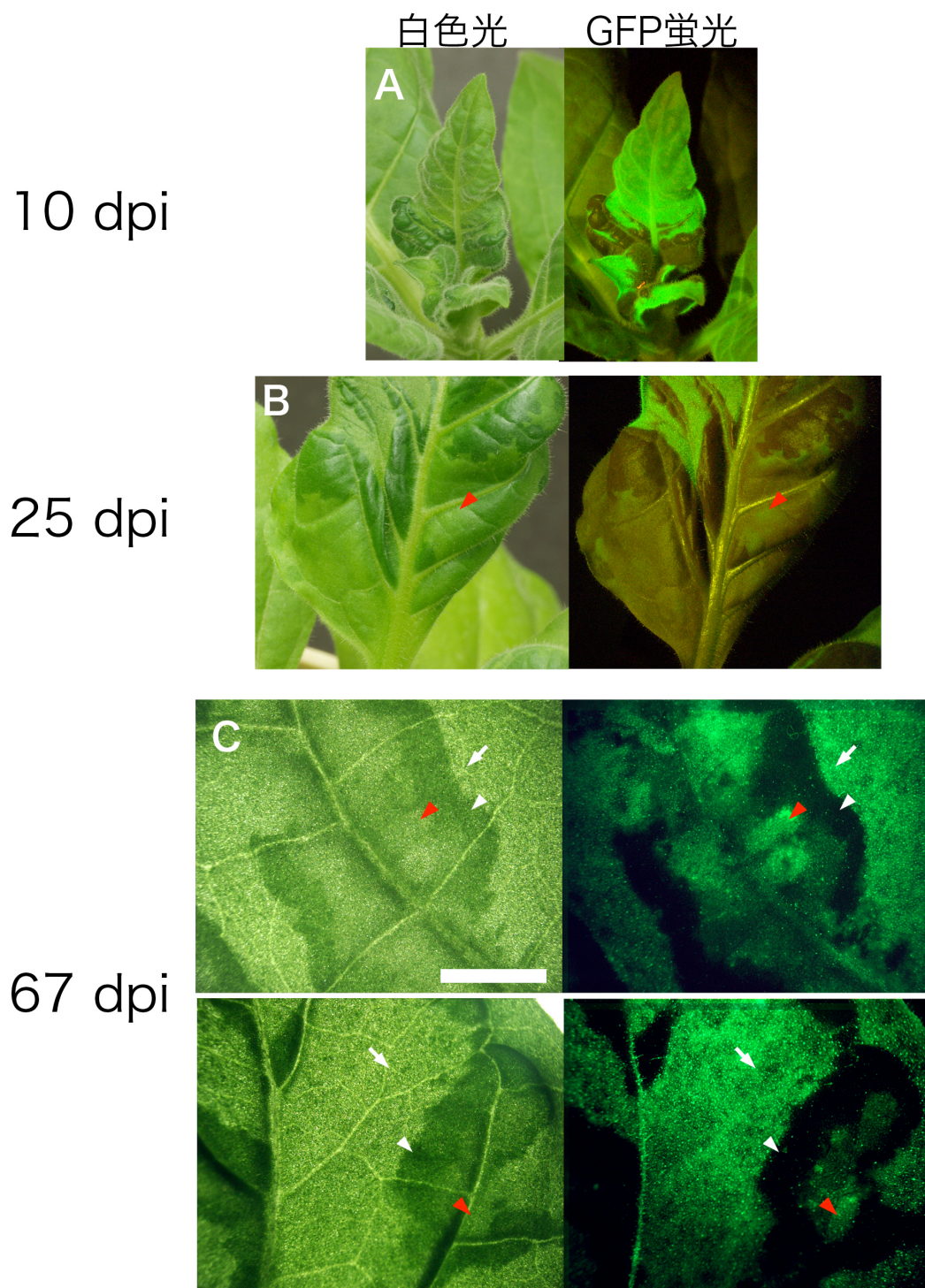
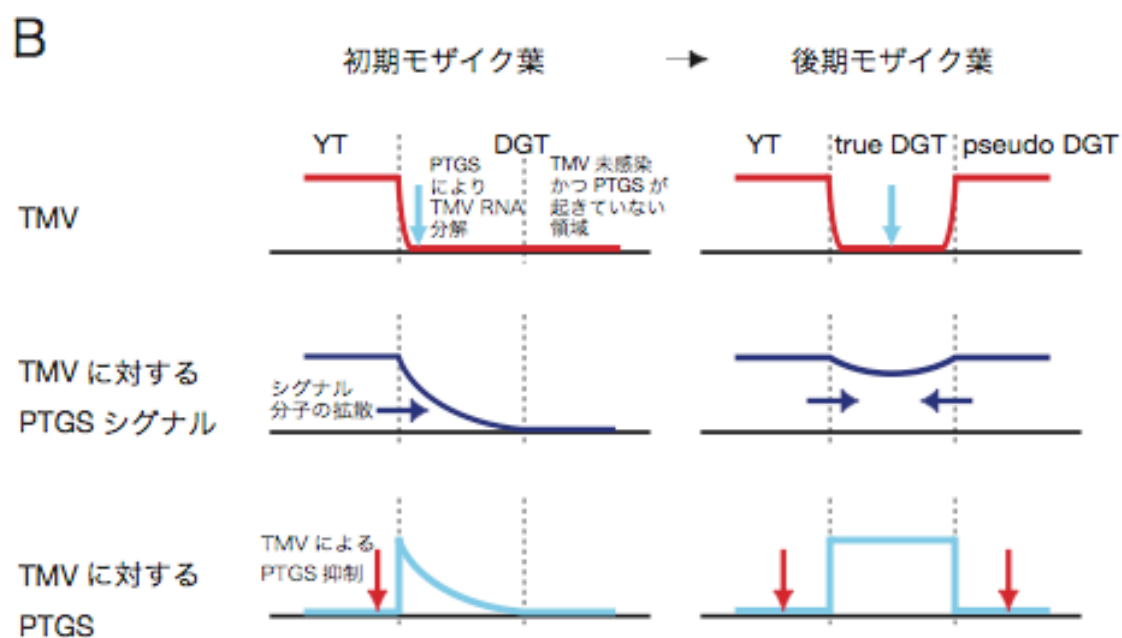
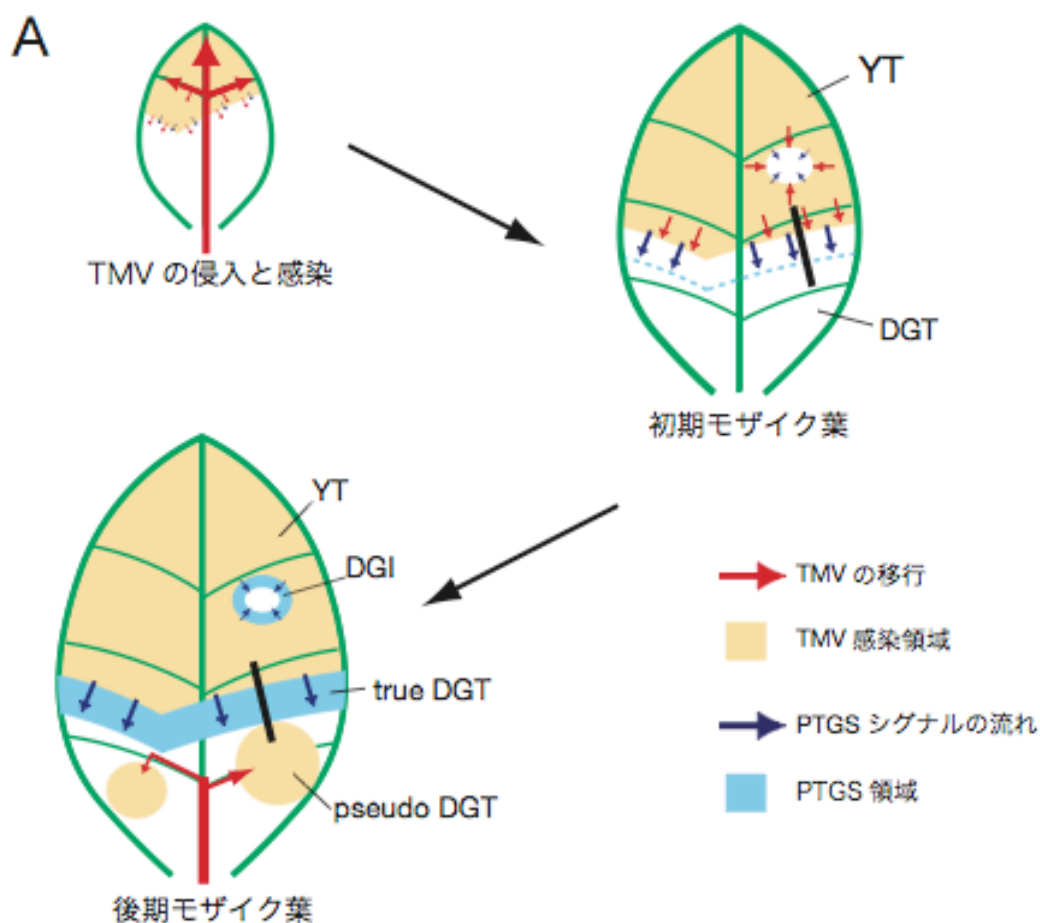


図20 pseudo DGTでのGFP蛍光の増加

TMVを接種したG3Sm2モザイク葉の、pseudo DGTでのGFP蛍光を経時観察した。矢印はYT、白矢尻はtrue DGT、赤矢尻はpseudo DGTを示す。(A)と(B)はデジタルカメラで、(C)は蛍光実体顕微鏡で撮影した。(C)のスケールバーは4 mm。



(説明は次頁)

図 21 モザイク症状のパターン形成機構モデル

(A) 上位葉に TMV が侵入してからモザイクが形成されるまでのウイルスと PTGS の動き。侵入した TMV は PTGS シグナルを生みだしながら感染域を拡大する (TMV の侵入と感染)。TMV の侵入に先立ってシグナルを受け取った細胞では PTGS が成立し、TMV の感染拡大を阻止する (初期モザイク葉)。PTGS が成立した領域 (水色) は後に true DGT となる。DGT のなかで PTGS が成立していなかった領域に後から TMV が侵入すると、pseudo DGT に変化する (後期モザイク葉)。

(B) パネル A の図中の黒線を断面としたときの、TMV、PTGS シグナルおよび PTGS のレベルをグラフ化した模式図。

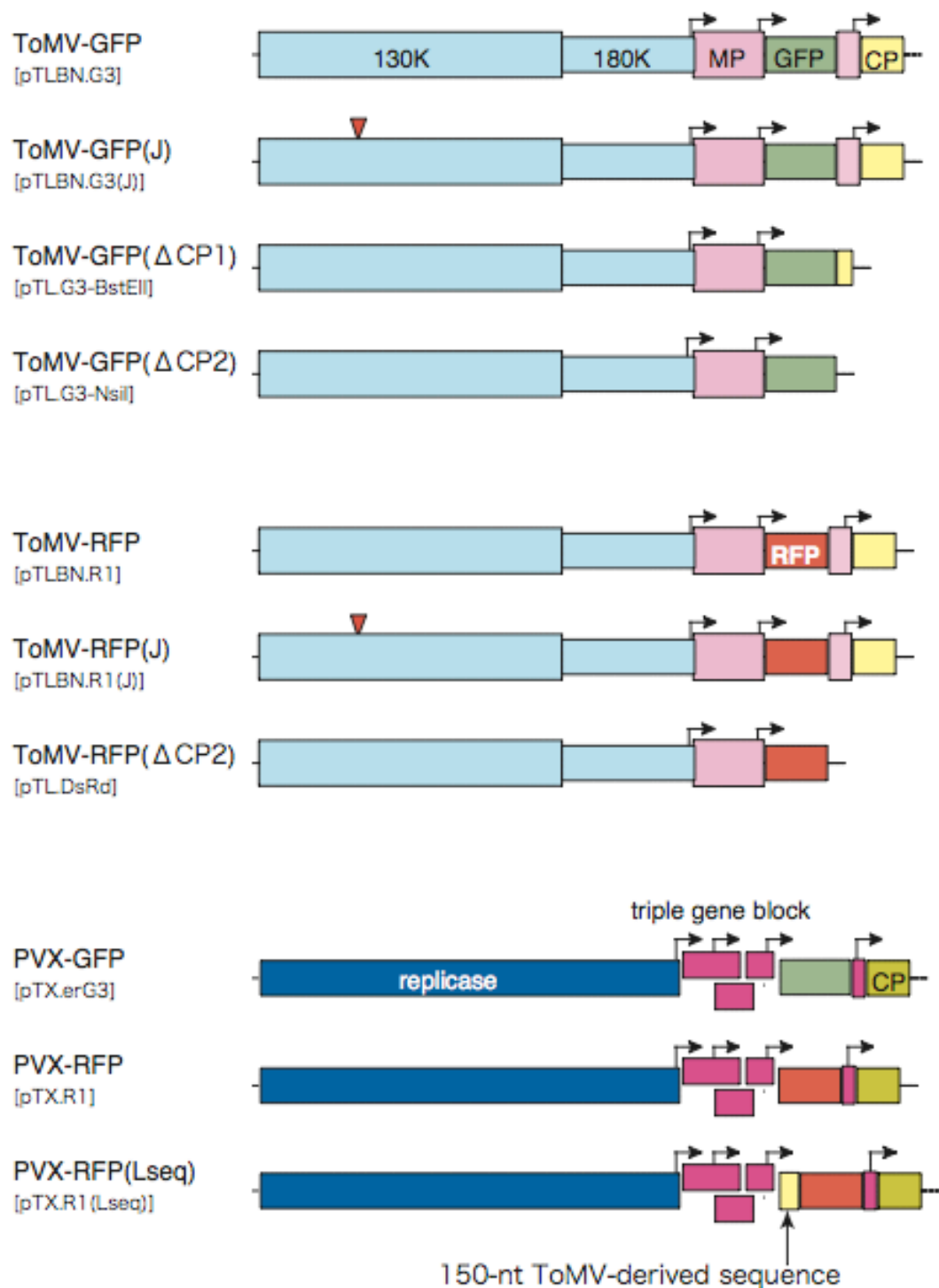


図 22 第 3 章の実験に使用した組換え ToMV および PVX のゲノム構造

左に組換えウイルスの名称を示し、カギ括弧内に感染性トランスクリプト作製の鋳型として用いたプラスミドの名称を記した。赤い三角は 130K 遺伝子の J 変異を、曲がった黒矢印はサブゲノム RNA プロモーターを表す。

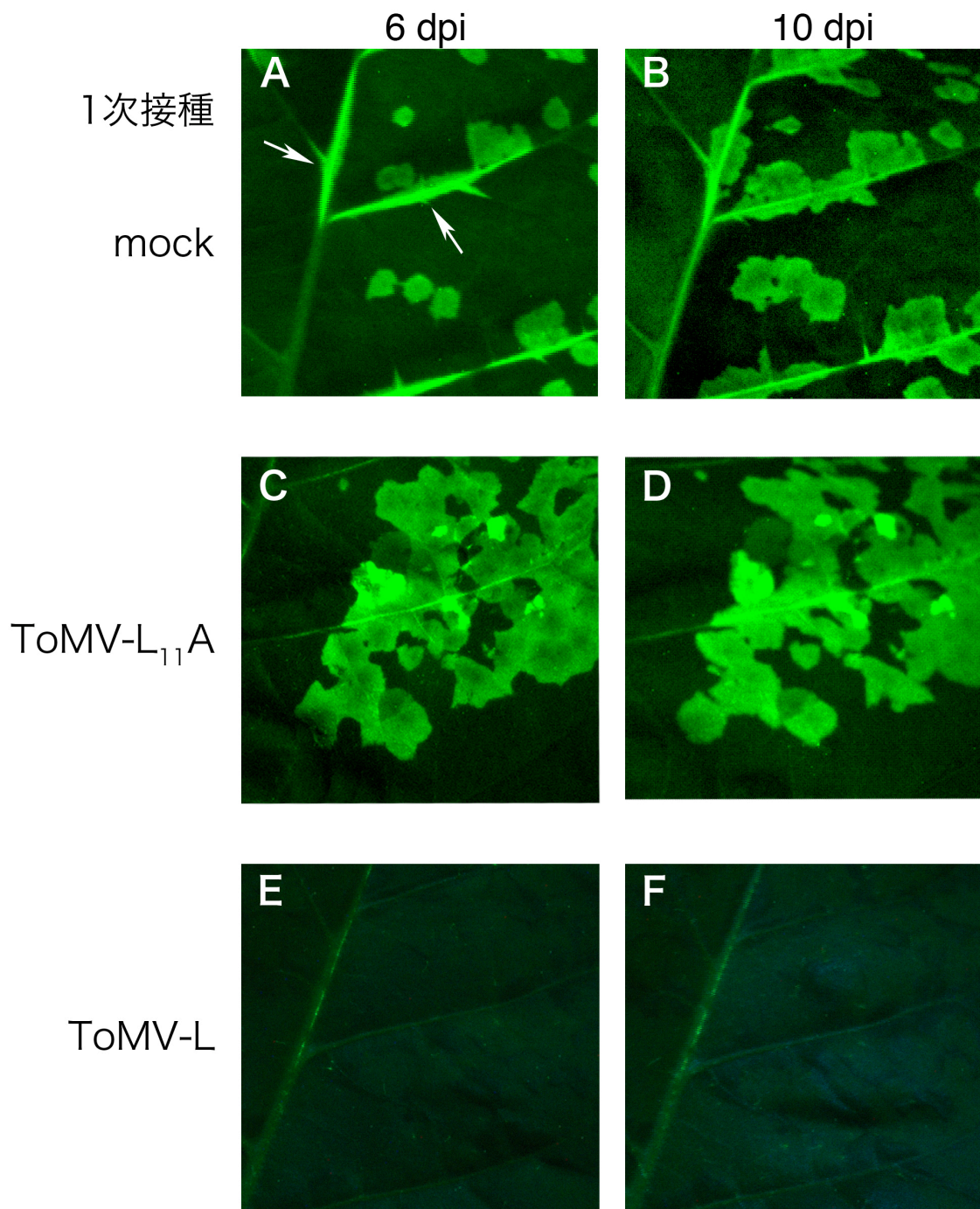


図23 1次ウイルス感染上位葉でのToMV-GFPの感染

NTタバコに1次ウイルスとしてモック (A, B)、ToMV-L₁₁A (C, D)またはToMV-L (E, F) を接種した。7日後に上位葉にToMV-GFPを接種し、さらに6日後 (A, C, E) と10日後 (B, D, F) にGFP蛍光を蛍光実体顕微鏡下で観察した。矢印は維管束系に沿った感染拡大領域を示す。

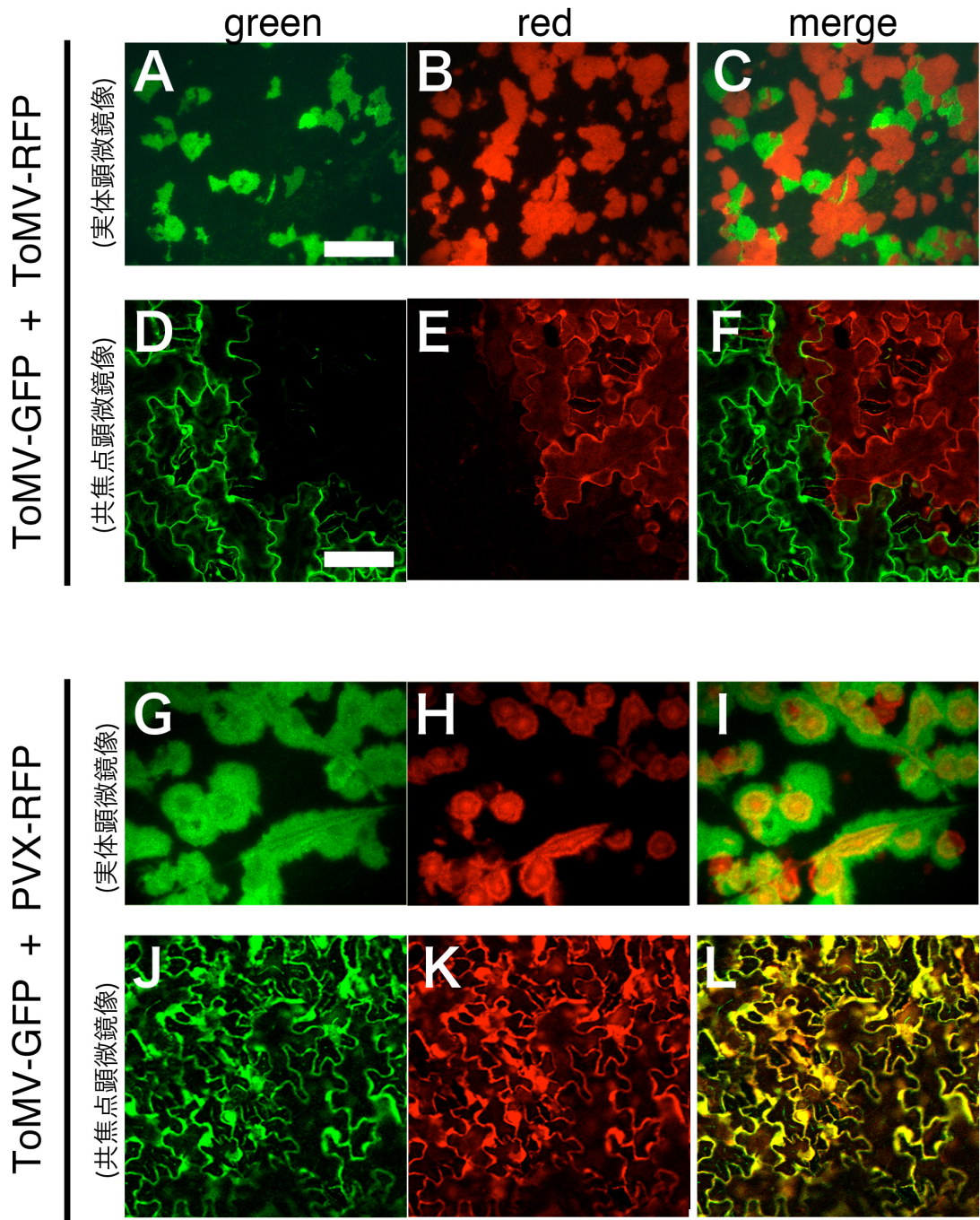


図24 ToMV同士は同一細胞に重複感染しない

ToMV-GFPとToMV-RFP (A～F) またはToMV-GFPとPVX-RFP (G～L) をタバコ葉に混合接種した。4～6日後にGFP蛍光(green)およびRFP蛍光(red)を実体顕微鏡 (A, B, C, G, H, I) または共焦点レーザー顕微鏡 (D, E, F, J, K, L) で撮影した。画像をPhotoshopで合成した (merge) 。スケールバーは実体顕微鏡像は4 mm、共焦点レーザー顕微鏡像は100 μ m。

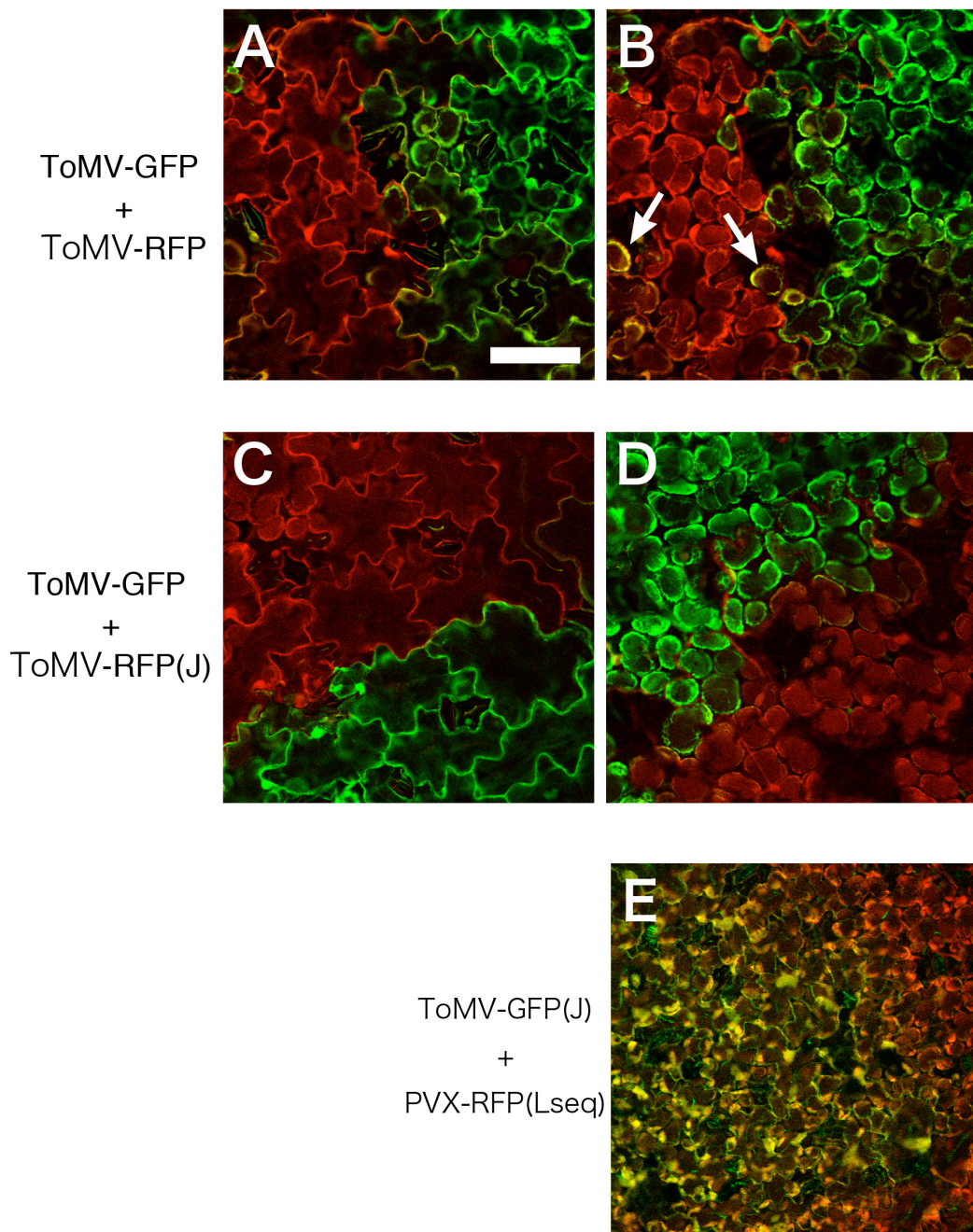


図25 J変異の有無とToMVどうしの排他性

2種類のウイルスをタバコに混合接種し、6日後に共焦点レーザー顕微鏡で撮影した。

(A, B) ToMV-GFPとToMV-RFPの組み合わせ。矢印はごくまれに見られた共感染細胞を示す。

(C, D) ToMV-GFPとJ変異を有するToMV-RFP(J)の組み合わせ。

(E) ToMV-GFP(J)とToMV配列を有するPVX-RFP(Lseq)の組み合わせ。

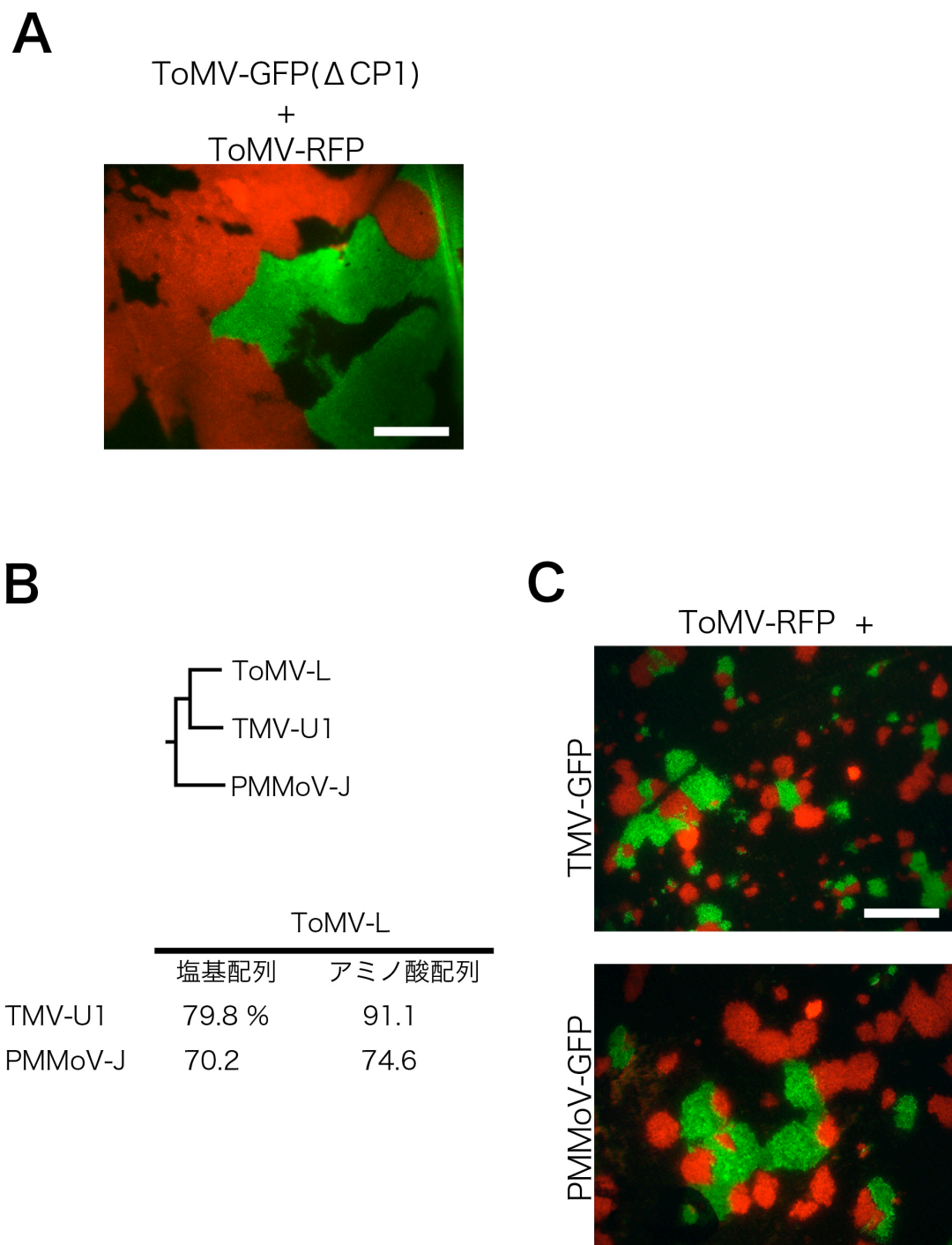


図26 ToMVの排他性の要因

(A) CPを発現しないToMV-GFP(Δ CP1)とToMV-RFPをタバコ葉に混合接種し、6日後に蛍光実体顕微鏡で撮影した。

(B) *Tobamovirus*属のToMV-L、TMV-U1およびPMMoV-JのゲノムRNA配列を基にした類縁関係（上）と、*Tobamovirus*間の複製酵素130K遺伝子の相同性（下）。

(C) TMV-GFP（上）またはPMMoV-GFP（下）をToMV-RFPとともに接種し、(A)と同様に観察。
スケールバーは4 mm。

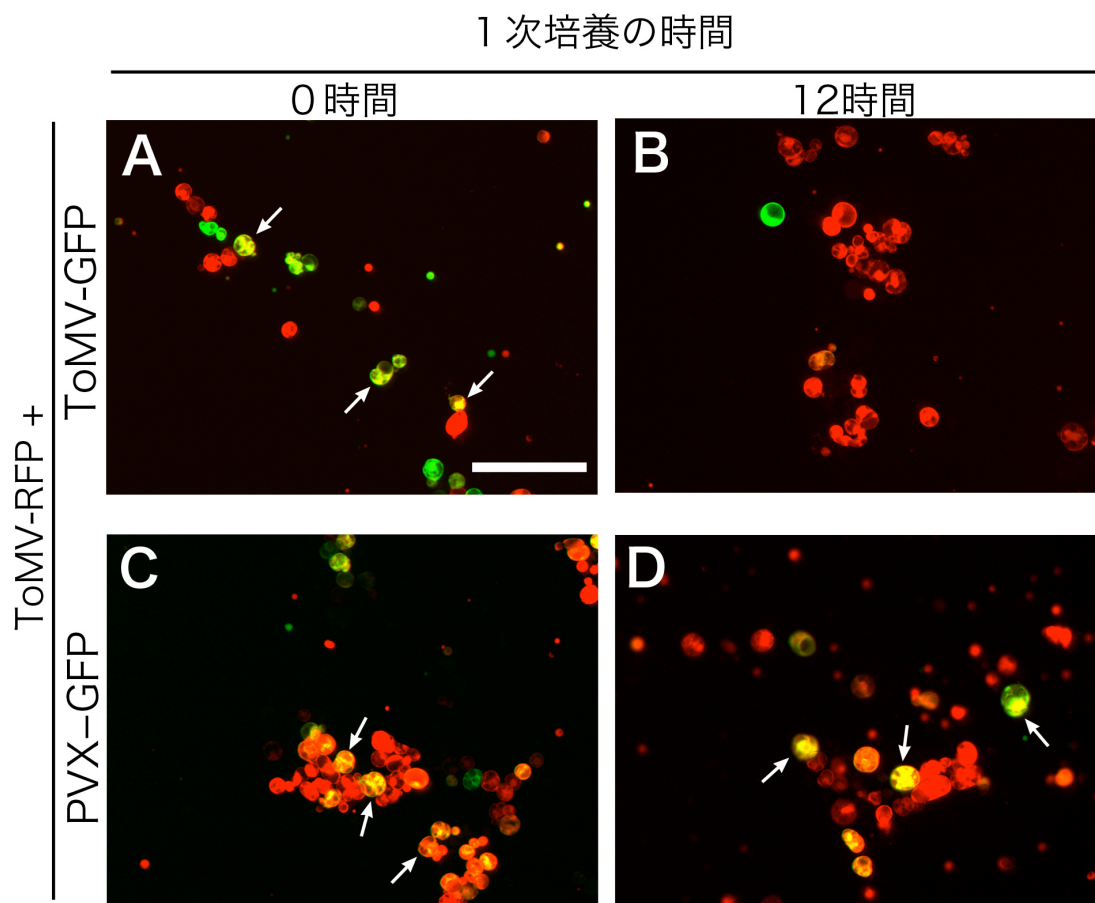


図27 BY2 プロトプラストでのToMVの排他性

BY2プロトプラストにToMV-RFPを接種した。1 次培養を0時間 (A, C)または12時間 (B, D)行なった後、ToMV-GFP (A, B)またはPVX-GFP (C, D)を接種した。さらに24時間培養した後、GFPとRFP蛍光像を撮影した。2枚の写真の合成像を示す。矢印は共感染細胞を示す。スケールバーは 200 μ m。

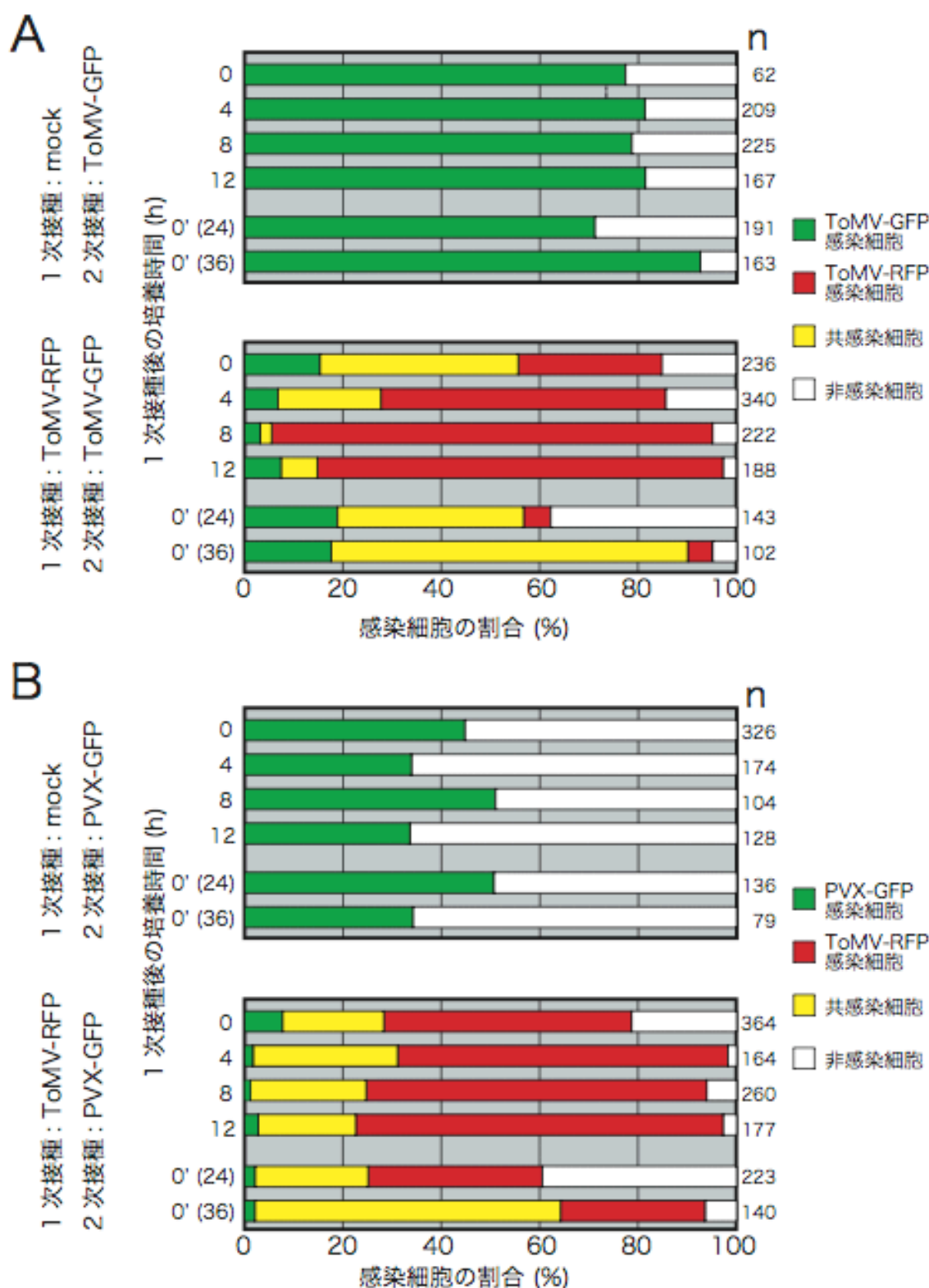


図 28 BY2 プロトプラストにおける ToMV の排他性

BY2 プロトプラストに mock (各パネル上) または ToMV-RFP (下) をエレクトロポレーションにより接種した。0、4、8、12 時間培養後、ToMV-GFP (A) または PVX-GFP (B) を再接種した。2 回目の接種から 24 時間培養した後、蛍光顕微鏡下で GFP および RFP 蛍光を発する細胞をカウントした。0' (24) と 0' (36) は、コントロールとして 2 種類の接種源を混合して同時に接種し、それぞれ 24 と 36 時間後に観察した。n は観察した細胞数を示す。

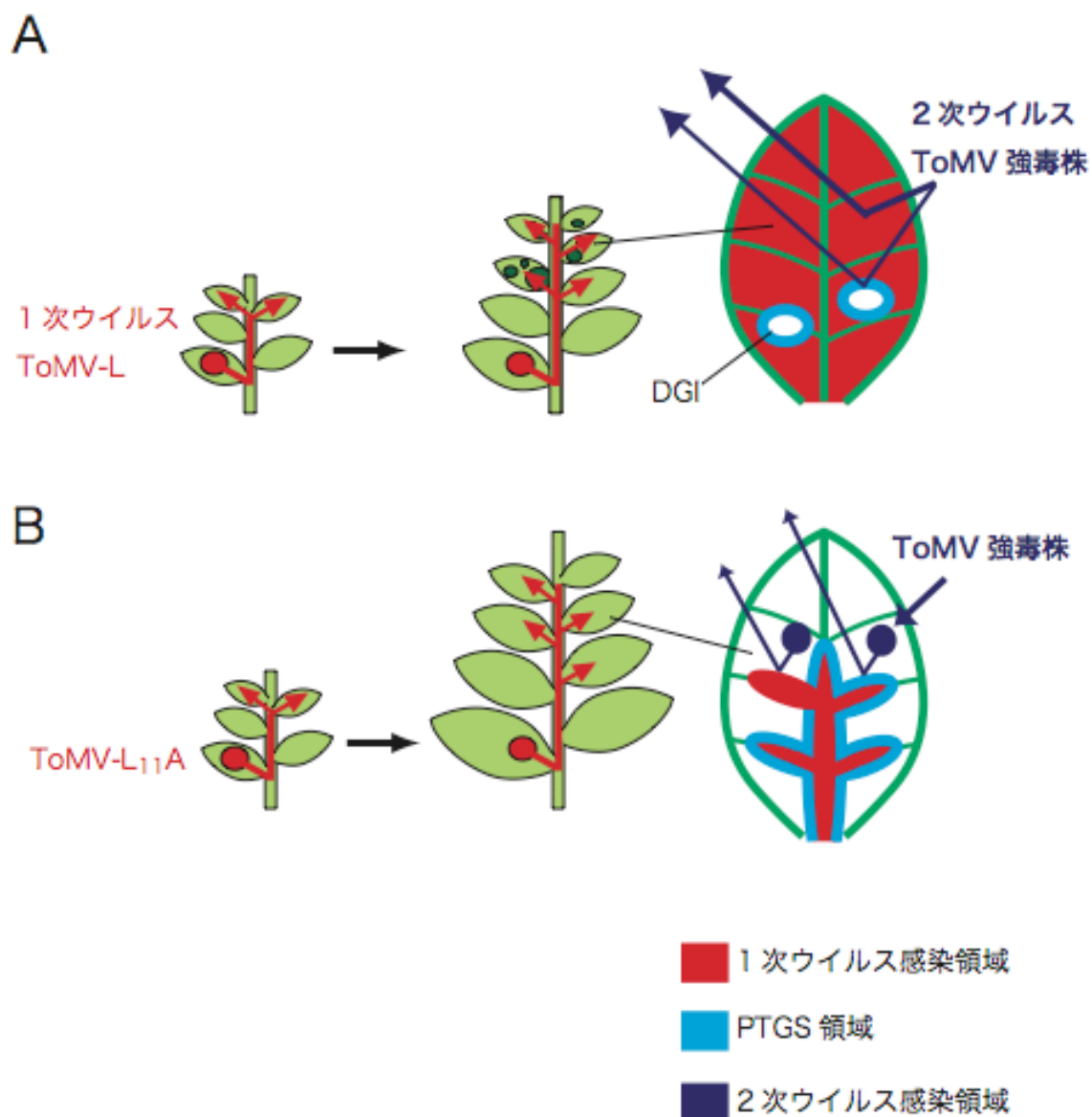


図 29 L と L₁₁A によるクロスプロテクションの違い

(A) ToMV-L 感染上位葉の YT にはウイルスがいるために、DGI では PTGS その他の抵抗性のために 2 次ウイルスがほとんど感染できない。

(B) L₁₁A 感染上位葉では PTGS のために L₁₁A の感染拡大が停止している。L₁₁A が感染しておらず PTGS も起きていない領域には 2 次ウイルスが感染できるが、維管束系を介した上位葉への移行は阻げられるため、発病しない。