

称号及び氏名 博士（応用生命科学） Anurag SUNPAPAO

学位授与の日付 平成23年3月31日

論文名 **Analysis of cyclic symptom development in tobacco  
infected with *Cucumber mosaic virus***  
(キュウリモザイクウイルス感染タバコにおける周期的  
病徴発現機構の解析)

論文審査委員 主査 大 木 理  
副査 小 田 雅 行  
副査 小 泉 望

論文要旨

The most common disease symptom when plants are systemically infected with viruses is mosaic. Characteristic of mosaic leaves consist of two areas: dark green islands and yellow-green tissues. The former contains few infectious viruses, whereas abundant CMV-infected cells occur in the latter. Several viruses including *Cucumber mosaic virus* (CMV) develop cyclic symptom expression in infected plants as mosaic leaves and then symptomless leaves, and again mosaic leaves. However, the mechanism of this phenomenon is not so far clarified.

There are numerous factors such as virus-encoded proteins and plant defense mechanism should be involved in the development of cyclic symptoms. For this aim, I have examined virus-plant interaction between the pathogenesis and their related molecular events in CMV-infected tobacco.

## **Chapter 1. Characterization of cyclic symptom expression in CMV-infected tobacco plants**

Tobacco plants inoculated with the CMV pepo strain (Pepo) induced cyclic mosaic symptom expression; mosaic and mottled leaves appeared first among the newly developing leaves (L7-9) above the inoculated leaf (L0), symptomless leaves then developed (L10-11), and mosaic leaves appeared again (L12-14). To clarify the formation of the cyclic symptoms by Pepo, the relationships between distribution of viral coat protein (CP) or viral RNA (vRNA) in the leaf primordia (LP, 2 to 3 mm) or young developing leaves (YDL, 1 to 2 cm) and symptom severity in the fully expanded leaves were analyzed. Large amounts of Pepo were detected in most cells of the YDL in the early infection periods, which later led to the development of mosaic and mottled leaves. Virtually no signals were detected in the LP/YDL for L11, which developed into symptomless leaves. However, Pepo was already separately distributed in the YDL at L13 in the later mosaic leaves. These results indicated that very few and uneven Pepo distribution in the symptomless leaves and mosaic leaves generated during

the late infection period was determined at LP stage, while viral distribution in the early mosaic leaves was not determined at the developing stage.

## **Chapter 2. The 2b protein of CMV is necessary for cyclic mosaic symptom expression in tobacco**

A 2b protein-defective mutant of the CMV Pepo strain ( $\Delta 2b$ ) induces only mild symptom and no cyclic symptoms in systemically infected tobacco plants. To clarify further the role of the 2b protein as an RNA silencing suppressor in the cyclic symptom expression, distribution of  $\Delta 2b$  in the shoot apical meristem (SAM) and LP was monitored. Time-course histochemical observations showed that  $\Delta 2b$  was distributed in SAM at 7 day postinoculation (dpi) but could not invade SAM and quickly disappeared from SAM, whereas Pepo transiently appeared in SAM from 4 to 10 dpi. Faint  $\Delta 2b$  signals were detected at 14 and 21 dpi in LP, whereas dense Pepo signals were observed in LP from 4 to 18 dpi. Northern blot analysis showed that short interfering RNA (siRNA) derived from  $\Delta 2b$ -RNA accumulated earlier in SAM and LP than that of Pepo. However, a similar amount of siRNA was detected in both Pepo- and  $\Delta 2b$ -infected plants at the late time points. Tissue printing analysis of the inoculated leaves indicated that the areas infected with Pepo enlarged faster than those infected with  $\Delta 2b$ , whereas accumulation of  $\Delta 2b$  in protoplasts was similar to that of Pepo. These findings suggest that the 2b protein of the CMV Pepo strain determines virulence by facilitating the distribution of CMV in SAM and LP via prevention of RNA silencing and/or acceleration of the cell-to-cell movement as well as promoted cyclic mosaic pattern in infected tobacco plants.

## **Chapter 3. Involvement of DCL2-4 and RDR1 in cyclic mosaic symptom development of CMV-infected tobacco**

In RNA silencing mechanism, RNA-dependent RNA polymerase (RDR) in plants synthesizes complementary RNA using viral RNA as the template

and the double-stranded RNA is then cleaved by Dicer-like proteins (DCL). The *Nicotiana tabacum* genome is considered to encode four DCL and six RDR homologues. DCL1 synthesizes 18-21 nt-long microRNA, whereas DCL2, DCL3 and DCL4 produce 22 nt, 24 nt and 21 nt-long siRNA, respectively, in the RNA silencing process. To clarify which components were involved in the viral titer change and the cyclic symptom development in CMV-infected tobacco, transgenic tobaccos in which DCL2, 3, 4, 2/4 or RDR1 down regulated were used and amounts of vRNA in YDL in the transgenic tobaccos were examined by Northern blot analysis. Most transgenic plants inoculated with Pepo exhibited the cyclic mosaic patterns. Amounts of vRNA were changed along with the leaf position similar to those in the case of wild-type tobacco. Furthermore, expression of those RNA silencing-related genes during high and low CMV infection were not significantly different among those transgenic plants. These results indicated that the inhibition of single DCL2-4 or RDR1 and double DCL2/4 did not affect the development of the cyclic mosaic symptom by CMV.

The results obtained in this study demonstrated the mosaic leaves development at the early infection stage was not determined but that at the late infection stage was already determined in LP. The interaction between the virus-encoded counter-defense 2b protein and the RNA silencing components was a key factor determining the severe symptom expression and the cycling symptom development. Experiments on the transgenic tobaccos suggested that the RNA silencing components compensated each other. To establish virus-tolerant crops, further analysis of systemic silencing signals and host defense proteins in the virus-infected plants will be needed.

## 審査結果の要旨

植物のウイルス病のもっとも代表的な病徴はモザイクであり、モザイク葉はウイルス粒子を多量に含む黄色部とウイルス粒子をほとんど含まない緑色部から構成されている。キュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus*: CMV) などのウイルスはタバコ (*Nicotiana tabacum*) などの宿主植物にモザイク葉、無病徴葉、モザイク葉という順序で周期的に病徴を発現するが、その機構は解明されていない。周期的病徴発現にはウイルスタンパク質や植物防御システムなど多様な因子が関与すると考えられる。本研究は、CMV 感染タバコをモデルとして、ウイルス感染における病徴発現とそれに関連する分子生物学的変動を解析したものである。

1. CMV Pepo 系統を接種したタバコは周期的病徴を発現し、接種葉 (L0) の上位の新展開葉 (L7-9) にモザイクを発現し、その上位に無病徴葉 (L10-11)、さらにモザイク葉 (L12-14) を展開した。この周期的病徴発現の機構を探るために、葉原基 (2-3 mm) と微小展開葉 (1-2 cm) におけるウイルス外被タンパク質とウイルス核酸の蓄積量と、それらが展開後に発現する病徴との関係を調べた。初期モザイク葉になる微小展開葉では、ほとんどの細胞から多量の CMV が検出された。無病徴葉になる葉の葉原基と微小展開葉では、CMV はほとんど検出されなかった。しかし、後期モザイク葉になる葉の葉原基と微小展開葉では、CMV が多量に検出される部位と検出されない部位とが分かっていた。これらの結果から、無病徴葉と後期モザイク葉におけるウイルス分布は葉原基の段階で決定されるが、初期モザイク葉におけるウイルス分布は葉原基の段階で決定されないことが明らかになった。

2. 植物の RNA サイレンシングに対する CMV のサブプレッサータンパク質である 2b が翻訳されないように改変した Pepo の変異株  $\Delta 2b$  をタバコに接種したところ、病徴は穏やかになり、周期的病徴発現は認められなくなった。そこで、周期的病徴発現における 2b タンパク質の機能を明らかにするために、 $\Delta 2b$  を接種したタバコの茎頂分裂組織と葉原基における  $\Delta 2b$  の動態を免疫組織観察により解析した。茎頂分裂組織では、Pepo は接種 4 日後から 10 日後まで継続して観察されたが、 $\Delta 2b$  は分裂組織にほとんど侵入できず、急速に分布域が縮小した。葉原基でも同様に、Pepo は接種 4 日後から 18 日後まで多量の分布が認められたのに対し、 $\Delta 2b$  は一部の葉原基でわずかに検出された。茎頂分裂組織と葉原基におけるノーザンブロット法では、CMV RNA に対する short interfering RNA が  $\Delta 2b$  の方が Pepo より早く蓄積し、その後の蓄積量に差は認められなかった。また、ティッシュブロット法では、スポット接種した  $\Delta 2b$  の病斑の拡大は Pepo に比べてかなり遅くなった。これらの結果から、CMV の 2b タンパク質は RNA サイレンシングの抑制と細胞間移行の促進により茎頂分裂組織と葉原基への感染を介助しており、Pepo の強病原性と周期的病徴発現を決定していることが明らかになった。

3. RNA サイレンシングの植物の因子には RNA 依存 RNA 複製酵素 (RDR) と Dicer 様タンパク質 (DCL) があり、DCL2-4 と RDR1 は植物におけるウイルス防御に関

与するとされているが、これらの CMV の周期的病徴発現における役割は明らかではない。そこで、サイレンシングによってこれらの遺伝子を抑制したタバコ系統を用いて、CMV 感染植物の微小展開葉におけるウイルス RNA の蓄積と病徴発現との関係を検証した。その結果、Pepo を接種したほとんどの遺伝子抑制タバコは、Pepo の場合とほぼ同様な周期的病徴を発現した。また、感染時におけるこれらの遺伝子の発現量は非組換えタバコの場合と、明確な差異は認められなかった。これらの結果から、DCL2-4 と RDR1 をそれぞれ単独で抑制しても、CMV の周期的病徴発現には影響しないことが明らかになった。

本研究により、CMV 感染タバコの感染初期のモザイクは葉原基の段階では決定されないが、無病徴葉と後期モザイク葉はその段階で決定されること、CMV の 2b タンパク質と植物の RNA サイレンシングが CMV の強病原性と周期的病徴発現を決定していることが明らかになった。遺伝子抑制タバコによる実験からは、植物のサイレンシング因子は機能を互いに補償することが分かった。これらの知見は、植物病理学ならびに応用植物科学の発展に大きく寄与するものと考えられる。よって、最終試験の結果とあわせて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。