

称号及び氏名 博士（農学）梁 宝成

学位授与の日付 平成 17 年 3 月 31 日

論文名 「植物ウイルスの重複感染による病徴激化機構に関する研究」

論文審査委員 主査 教授 大木 理

副査 教授 足立 泰二

副査 教授 石井 実

論文要旨

植物ウイルスが宿主植物に感染すると、一次感染細胞で増殖した後、隣接細胞への細胞間移行、篩管を介した他の組織への長距離移行を行い、植物全体へと感染を拡大する。植物ウイルスの感染と移行は、それぞれの段階でウイルス因子と宿主因子とが相互に複雑に作用することで制御されており、結果として病徴が出現して発病が起こる。宿主の病徴決定因子についてほとんど明らかにされていないが、ウイルスの病原性因子については多くのウイルスで同定されつつあり、その多くは宿主 RNA サイレncingを抑制するサプレッサーとして働くことが知られている。RNA サイレncingは宿主にとって不都合な RNA を効率的に排除する機構で、宿主は有害な遺伝子であるウイルスから身を守る抗ウイルス機構として発達させ、一方でウイルスはそれに対する対抗策としてサプレッサーを発達させたものと考えられている。

栽培圃場などの野外条件では、同一の宿主植物に複数のウイルスが重複感染することが多い。一般にそのような植物では単独感染の植物に比べて病徴が激しくなり、大きな被害をもたらすが、その機構の詳細については明らかではない。一方、病原性をほとんど示さない弱毒ウイルスの接種による強毒ウイルス感染からの回避が防除技術として再び注目されるようになったが、弱毒ウイルスと他のウイルスとの重複感染が病徴に与える影響についての研究は全く行われていない。

そこで、本研究では、キュウリモザイクウイルス *Cucumber mosaic virus: CMV* と 2 種の *Potyvirus* 属ウイルス（ジャガイモ Y ウイルス *Potato virus Y: RVY* とズッキ

一ニ黄班モザイクウイルス *Zucchini yellow mosaic virus*: ZYMV) との重複感染について、重複感染による病徴激化機構を解析した。また、病徴激化因子を特定するとともに、弱毒ウイルスを用いた重複感染実験系を用いて、病徴激化の有無と干渉効果の維持についての検討を行った。

1. CMV の 2b タンパク質はタバコに全身感染できない PVY の全身感染性を補償する

PVY は通常タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc) に全身感染するが、PVYT 01 分離株は感染しても上位葉に移行できない。しかし、この PVY をタバコに全身感染する CMV pepo 系統と同時に接種すると PVY も全身に移行できるようになり、激しいえそ病徴を上位葉にも現すようになる。感染植物の各部位の茎断面をティッシュプロット法により検定したところ、PVY は重複感染個体ではほとんどの組織から検出されたが、単独感染個体では上部以外の茎でわずかに検出された。一方、CMV は単独感染個体、重複感染個体とも、すべての組織から検出された。感染個体の茎を免疫組織化学的に詳細に観察すると、PVY は単独感染個体では、internal phloem (IP) には移行せずに external phloem (EP) のみで観察されるが、重複感染個体では EP、木部柔細胞、IP のいずれにからも検出された。

次に、PVY が CMV との重複感染によって全身移行することに、CMV のサプレッサーである 2b タンパク質が関与している可能性を検証するために、2b タンパク質を翻訳しないようにさせた変異体 pepo Δ 2b を作成し、PVY と重複接種したところ、PVY の感染は単独感染個体の場合と同様に制限された。

以上の結果から、宿主植物であるタバコは RNA サイレncing によって PVY T01 分離株の全身移行を抑制して PVY が全身感染できなくしているが、CMV pepo 系統が重複感染すると CMV のサプレッサーである 2b タンパク質がその抑制を解除し、PVY が全身感染できるようになるものと考えられた。

2. CMV 2b タンパク質は共接種キュウリ ZYMV 接種子葉の枯死を決定する

キュウリ (*Cucumis sativus* cv. Sagami-hanjiro) 幼苗の子葉に CMV pepo 系統と ZYMV Z5-1 分離株を単独接種すると、病徴はそれぞれ軽微な退緑斑と無病徴である。また、CMV と ZYMV の混合ウイルス源を接種した場合は、軽微な退緑斑を現す。し

かし、2枚の子葉の一方に、CMV、他方に ZYMV を同時に接種（共接種）した場合、CMV 接種子葉の病徴は軽微であるが、ZYMV 接種子葉は葉脈黄化を発症し、接種 20 日後までに徐々に細胞死を起こして枯死する。そこで、この子葉枯死の機構を解析した。重複感染キュウリ子葉におけるウイルス蓄積量を ELISA 法により経時的に測定したところ、ZYMV 共接種キュウリ、CMV 単独接種キュウリの場合とも、CMV 接種子葉では CMV の蓄積量は段階的に増加した。一方、ZYMV 接種子葉では、CMV は 9 ～14 日後に蓄積量の急激な増大が認められた。ZYMV の蓄積量は、単独接種と共接種キュウリ子葉で有意な差は認められなかった。

次に、子葉枯死に CMV の 2b タンパク質が関与している可能性を検証するために、2b タンパク質を翻訳できない変異体 *pepo Δ 2b* を用いて比較実験を行ったところ、キュウリでの全身移行には 2b タンパク質が必須であるというこれまでの知見とは異なり、*pepo Δ 2b* はキュウリに全身感染した。また、キュウリ子葉に *pepo Δ 2b* と ZYMV を共接種したところ、ZYMV 接種子葉における *pepo Δ 2b* の蓄積量は CMV の場合とほぼ同様に顕著に増加したが、接種後 30 日を経過しても細胞死は誘導しなかった。

以上の結果から、共接種キュウリの ZYMV Z5-1 分離株接種子葉の枯死には、ZYMV が CMV *pepo* 系統に先行して感染することが必須であり、CMV 蓄積量の顕著な増加ではなく、CMV のサプレッサーである 2b タンパク質の蓄積が不可欠であることが明らかになった。

3. サプレッサー機能が低下した弱毒ウイルスは他のウイルスと重複感染しても病徴を激化させない

以上の結果から、植物ウイルスの重複感染による病徴激化にはサプレッサーがきわめて重要な働きをしていることが明らかになったので、次にサプレッサー機能が低下しているウイルス弱毒株が、他ウイルスと重複感染した場合の病徴激化の有無と干渉効果の維持について検証を行った。

まず、タバコに CMV 弱毒株 CM95 分離株 (CM95-CMV) と PVY T01 分離株を重複接種したところ、*pepo Δ 2b* との重複感染の場合と同様に、PVY の全身移行は制限された。一方、CMV 強弱株 *pepo* 系統の 2b タンパク質において、CM95-CMV の弱病原性に重要である 1 アミノ酸のみを CM95-CMV と同じになるように変異させた

CMV 変異体と重複接種したところ、PVY の全身移行は制限されるようになった。これらの結果から、弱毒株 CM95-CMV は pepo Δ 2b と同様に、2b タンパク質のサプレッサー機能が強く抑制されていることが確かめられた。

次に、キュウリ幼苗の各子葉に、CMV と ZYMV 弱毒株 2002 分離株 (2002-ZYMV) を共接種したところ、ZYMV 強毒株 Z5-1 分離株 (Z5-1-ZYMV) との重複感染の場合とは異なり、2002-ZYMV 接種子葉は細胞死を起こさなかった。また、共接種キュウリでは、サプレッサーである HC-Pro のみを 2002-ZYMV と同じアミノ酸にした Z5-1-ZYMV の変異体は細胞死を誘導せず、逆に、HC-Pro のみを Z5-1-ZYMV と同じアミノ酸にした 2002-ZYMV の変異体は細胞死を誘導した。ZYMV の病原性は HC-Pro が決定していることが明らかにされており、弱毒株 2002-ZYMV は HC-Pro の機能が大幅に低下しているものと考えられた。

以上の結果から、弱毒株 CM95-CMV と 2002-ZYMV はいずれもサプレッサー機能が低下しており、他のウイルスと重複感染しても病徴を激化させないことが明らかになった。

さらに、これらの弱毒ウイルスについて、重複感染時における干渉効果を検証した。ZYMV の被害が深刻なキュウリ (*C. sativus* cv. Tsuyataro) では、CMV は強毒株 Z5-1-ZYMV との重複感染では増殖性が高まって病徴が激化したが、弱毒株 2002-ZYMV とでは単独感染の場合と比べて顕著な増殖は認められなかった。また、2002-ZYMV と Z5-1-ZYMV の塩基配列の相違 1 塩基を識別する遺伝子診断法を確立して適用したところ、2002-ZYMV が重複感染時にも ZYMV 強毒株に対して十分な干渉効果を示すことが確かめられた。一方、CMV の被害が大きいトマト (*Lycopersicon esculentum* cv. Momotaro T93) では、弱毒株 CM95-CMV は PVY 0 系統と重複感染すると増殖性はやや高まる傾向にあったが、病徴激化や干渉効果の低下は認められなかった。

本研究の結果、CMV と *Potyvirus* 属ウイルスの重複感染による病徴激化が、それぞれのサプレッサーによって引き起こされることが明らかになった。一方、サプレッサー機能が低下したために病原性が弱まった弱毒ウイルスは、RNA サイレンシングを抑制する能力は低く、他ウイルスと重複感染しても病徴を激化させる可能性はほとんどないものと考えられた。実際に、弱毒株 CM95-CMV と 2002-ZYMV は重複感染

時にも干渉効果を維持したことから、異種ウイルスが混発しやすい露地栽培でもサブレッサー機能の低下を確認したタイプの弱毒ウイルスを利用すれば、安全で実用的な植物ウイルス防除が期待できる。

審査結果の要旨

栽培圃場などの野外条件では、同一の宿主植物に複数のウイルスが重複感染することが多い。一般にそのような植物では単独感染の植物に比べて病徴が激しくなり、大きな被害をもたらすが、その機構の詳細については明らかでない。一方、病原性をほとんど示さない弱毒ウイルスの接種による強毒ウイルス感染からの回避が防除技術として再び注目されるようになったが、弱毒ウイルスと他のウイルスとの重複感染が病徴に与える影響についての研究は全く行われていない。そこで、本研究では、キュウリモザイクウイルス *Cucumber mosaic virus*: CMV と 2 種の *Potyvirus* 属ウイルス (ジャガイモ Y ウイルス *Potato virus Y*: PVY とズッキーニ黄斑モザイクウイルス *Zucchini yellow mosaic virus*: ZYMV) との重複感染について、その病徴激化機構を解析した。また、病徴激化因子を特定するとともに、弱毒ウイルスを用いた重複感染実験系を用いて、病徴激化の有無と干渉効果の維持についての検討を行った。

1. PVY はタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc) に通常全身感染するが、PVY T01 分離株は感染しても上位葉に移行できない。しかし、この PVY をタバコに全身感染する CMV pepo 系統と同時に接種すると PVY も全身に移行できるようになり、激しいえそ病徴を上位葉にも現すようになる。感染植物の各部位の茎断面をティッシュプロット法により検定したところ、PVY は重複感染個体ではほとんどの組織から検出されたが、単独感染個体では上部以外の茎でわずかに検出された。感染個体の茎を免疫組織化学的に詳細に観察すると、PVY は単独感染個体では internal phloem (IP) には移行せずに external phloem (EP) のみで観察されるが、重複感染個体では EP、木部柔細胞、IP のいずれにからも検出された。また、2b タンパク質を翻訳しないようにさせた変異体 pepo Δ 2b を作成し、PVY と重複接種したところ、PVY の感染は単独感染個体の場合と同様に制限された。以上の結果から、宿主は RNA サイレンシングによって全身移行を抑制して PVY が全身感染できなくしているが、CMV が重複感染すると 2b タンパク質がその抑制を解除し、PVY が全身感染できるようになると考えられた。

2. キュウリ (*Cucumis sativus* cv. Sagami-hanjiro) 幼苗の2枚の子葉の一方に CMV pepo 系統、他方に ZYMV Z5-1 を同時に接種 (共接種) すると ZYMV 接種子葉は枯死することを見だし、この子葉枯死の機構を解析した。重複感染キュウリ子葉におけるウイルス蓄積量を ELISA 法により経時的に測定したところ、ZYMV 接種子葉では、CMV は 9~14 日後に蓄積量の急激な増大が認められた。また、キュウリ子葉に pepo Δ 2b と ZYMV を共接種したところ、ZYMV 接種子葉における pepo Δ 2b の蓄積量は CMV の場合とほぼ同様に顕著に増加したが、細胞死は誘導しなかった。以上の結果から、枯死には ZYMV が CMV pepo 系統に先行して感染することが必須であり、2b タンパク質の蓄積が不可欠であることが明らかになった。

3. 植物ウイルス弱毒株が、他ウイルスと重複感染した場合の病徴激化の有無と干渉効果の維持について検証を行った。その結果、弱毒株 CM95-CMV と 2002-ZYMV はいずれも植物がウイルスを標的として発動する RNA サイレンシングに対するサプレッサーの機能が低下しており、他のウイルスと重複感染しても病徴を激化させないことが明らかになった。また、それらが重複感染時においても、実用的な干渉効果を維持することが分かった。

本研究の結果、CMV と *Potyvirus* 属ウイルスの重複感染による病徴激化が、それぞれのサプレッサーによって引き起こされることが明らかになった。一方、サプレッサー機能が低下したために病原性が弱まった弱毒ウイルスは、RNA サイレンシングを抑制する能力は低く、他ウイルスと重複感染しても病徴を激化させる可能性はないものと考えられた。実際に、弱毒株 CM95-CMV と 2002-ZYMV は重複感染時にも干渉効果を維持したことから、異種ウイルスが混発しやすい露地栽培でもサプレッサー機能の低下を確認したタイプの弱毒ウイルスを利用すれば、安全で実用的な植物ウイルス防除が期待できる。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 (農学) の学位を授与することを適当と認める。