

報告年月日	2005 年 5 月 11 日
報告者氏名	高橋 翼
職種 (○で囲む)	○研究員 RA
所属 (RA のみ)	研究科 専攻 ( 大学配属 年度入学)
担当 (指導) 教員氏名	吉川 信幸
申請研究テーマ (50 字以内)	植物ウイルスの温度変化に対する生存戦略メカニズムの解析
<p>採用によって得られた成果</p> <p>具体的に記すこと。 (今年度の申請をふまえて、何が解決され、何が問題として残ったか、予想していなかった結果など)</p> <p>各項目の長さを適宜調整し、全体で 2 ページに収まるように記すこと。</p> <p>図表を入れても構わない。</p>	<p><b>研究背景</b></p> <p>一般的な植物ウイルスが宿主植物に感染すると、(1) 侵入した細胞でのウイルス核酸の複製とタンパク質の合成、(2) 隣接細胞への移行、(3) 植物個体全体への移行という 3 段階を経て感染が成立する。このうち (1) の段階において、植物ウイルスは宿主植物による PTGS (Post Transcriptional Gene Silencing) による防御機構を打破するために、自身がコードするサプレッサーによって PTGS を抑制し複製・増殖を行っていると考えられている。</p> <p>さらに、植物ウイルスには、感染植物において激しい病徴を示す強毒性ウイルスと増殖力が低くほとんど病徴を示さない弱毒性ウイルスのが存在する。寒冷地植物 (果樹) に適応した植物ウイルスは宿主植物に重大な病気を引き起こすこと無く潜在的に感染している場合が多い。このことは寒冷地植物に適応した植物ウイルスは宿主植物で爆発的に増殖するよりも、増殖量のある一定量で調節することで、生存戦略的に優位になるという可能性を考えることができる。</p> <p>しかし、これまでに植物ウイルスと温度との関連性を示した研究報告、寒冷地植物 (果樹) に適応する植物ウイルスについての研究報告は少ない。このため本研究の成果は植物ウイルスの生存戦略について新たな情報をもたらす可能性が考えられる。</p> <p><b>目的</b></p> <p>本研究においては、寒冷地植物 (果樹) に適応した植物ウイルスであるリンゴ小球形潜在ウイルス (<i>Apple latent spherical virus</i>, ALSV) を中心に研究を進めていく。第一の目的として、植物の防御機構 (PTGS) に対抗するために植物ウイルスが備えているサプレッサーに着目し、これまで不明の ALSV のサプレッサーの同定を行う。さらに他の植物ウイルスがコードしている既知のサプレッサーと ALSV サプレッサーの能力の比較を異なる温度条件下で行うことで、ALSV の寒冷地植物への適応能力の解明にアプローチする。第二の目的として ALSV の生存戦略をより詳しく理解するために、他の植物ウイルスの生存戦略と比較・検討する。すなわち、植物ウイルスが単独感染のとき、または他の植物ウイルスとの重複感染のときで、それぞれの植物ウイルスの性状の変化を調べて行く。さらに同様の解析を温度変化条件 (主に低温条件下) で行うことで、寒冷地植物に適応する植物ウイルスの優位性を明らかにしていく。このように本研究では、植物ウイルスの生存戦略 (複製・増殖、細胞間移行、組織間移行、局在性) に温度がどのように関与 (影響) しているか、さらには同種・同属または異種の植物ウイルスの間における相互作用 (住み分け、RNA サイレンシング、干渉作用、シナチズム現象) を組織レベル、細胞レベルで明らかにすることを旨とする。</p> <p><b>研究方法</b></p> <p>ALSV のサプレッサーの同定、ならびに既知の植物ウイルスのサプレッサーとの能</p>

力比較は、人的に PTGS を誘導した植物体において、個々の植物ウイルスがコードする遺伝子（サプレッサー、またはサプレッサー候補）を発現させ、PTGS の抑制レベルで判断する。遺伝子発現にはアグロバクテリウムを利用する方法、または植物ウイルスベクターを用いる方法で行う。

植物ウイルス間相互作用の解析は植物ウイルスのゲノムに GFP を組み込んだキメラウイルスを用いて、植物ウイルスの挙動を可視化することで行う。現在までに、ALSV の感染性 cDNA クローンを基に、ゲノムに外来遺伝子クローニングサイトを挿入した ALSV ベクターが構築されている (Li et al., 2004)。さらに、この ALSV ベクターに GFP を発現させることで、感染植物における ALSV の挙動がリアルタイムに追跡できるようになっている (Li et al., 2004)。加えて、GFP を発現するキメラ植物ウイルス {カブモザイクウイルス (TuMV)、ズッキーニ黄斑モザイクウイルス (ZYMV)、インゲンマメ黄斑モザイクウイルス (BYMV)} を用いて研究を行い、これらのキメラウイルスが感染した植物を蛍光顕微鏡で観察することにより、それぞれの植物ウイルスの感染植物における感染経路を可視化する。さらに ALSV の生存戦略（主に組織内局在性）に影響をおよぼす因子を調べるために、これらの因子と GFP (ALSV の挙動を追跡するため) を同時に発現させることを考えている。現時点では 1 つの外来遺伝子の発現能力を有する ALSV ベクターを改変し、複数の外来遺伝子を同時に発現する能力を有した ALSV ベクターを構築する。また、上記研究を細胞レベルで行うために、タバコ BY-2 懸濁培養細胞による遺伝子発現システムを構築する。

#### 成果と考察

ALSV のサプレッサーの同定については、現在アグロバクテリウムによる遺伝子発現系を構築中である。ALSV がコードする遺伝子（サプレッサー候補）を個々にバイナリーベクターに組み込み、コンストラクトを構築中である。構築されたコンストラクトにより順次アグロバクテリウムを形質転換し、研究を進めて行く。宿主植物での増殖力が比較的低い ALSV のコードするサプレッサーは植物の PTGS の抑制機能が弱いことが想定できる。そのために、ALSV のサプレッサーを確実に同定することが現時点での課題である。

次に、ALSV の生存戦略へ影響をおよぼす因子を解析するための複数の外来遺伝子を同時に発現させる能力を備えた ALSV ベクターを構築中である。これまでにコンストラクトの構築は完了し、これらのコンストラクトを実際に宿主植物に接種しウイルスベクターとしての活性試験、遺伝子発現の試験を行い、実際の研究に導入していく予定である。さらに本研究を遂行するために開発を目指している複数の外来遺伝子発現 ALSV ベクターは本研究への利用だけでなく、より高度な植物遺伝子解析などへ応用されていくことが期待できると考えている。

最後に、細胞レベルでの解析を行うためにタバコ BY-2 懸濁培養細胞を用いた遺伝子導入系について培養条件を確立した。現在は遺伝子導入技術の確立目的に研究を進めている。確立後には実際の研究資料について実験を行って行く。BY-2 懸濁培養細胞を用いることで、研究の簡略化、材料の安定供給、研究結果の再現性（安定）が向上するものと考えている。

#### 発表論文など

なし

#### 学会発表など

高橋 翼・長岡栄子・佐藤知香子・木下里美・奥田誠一・小坂能尚・夏秋知英 (2005) インゲンマメ黄斑モザイクウイルスにおける干渉作用の可視化. 平成 17 年度日本植物病理学会大会