

作成者	所属（専攻）・氏名 連合農学研究科生物環境科学専攻 吉川 信幸 連絡先（内線・メール） 6150 yoshikawa@iwate-u.ac.jp
研究課題名 （英語名）	寒冷地果樹とそれに適応した植物ウイルス間の相互作用の解明 Understanding of interaction between the fruit trees in the cold regions and plant viruses that are adopted to those trees
研究分野及びキーワード	研究サブグループ：熱に対する生物の生存戦略メカニズム研究分野 研究キーワード：（寒冷地果樹）（植物ウイルスベクター）（VIGS）
研究協力者 （氏名・所属等）	磯貝 雅道（連合農学研究科生物環境科学専攻・助教授）

研究成果報告

目的

リンゴをはじめとする寒冷地果樹類に感染しているウイルスは、重大な病気を引き起こす場合もあるが、一般には植物体に影響せず潜在的に感染している例が非常に多い。これは植物側のウイルスに対する防御機構と、ウイルス側の病原力とのバランスの結果と考えることができる。本研究では先ず、寒冷地果樹から分離したリンゴ小球形潜在ウイルス（ALSV）をウイルスベクターに改変し、これを利用して、ウイルス感染と宿主の防御応答（ウイルス誘導ジーンサイレンシング、VIGS）の関連を明らかにする。さらに応用研究として、果樹ウイルスベクターを利用したリンゴでのVIGS誘導システムの開発研究を実施し、現在技術的に困難な果樹のポストゲノム研究の有効な新技術として利用しようとする。

研究結果

1) リンゴ潜在性ウイルスを利用した遺伝子安定発現型ウイルスベクターの開発（図1）

リンゴ小球形潜在ウイルス（ALSV）は病気を起こさない潜在性ウイルスである。本研究で先ず ALSV のウイルスベクターへ改変した。ALSV ゲノムの RNA2 がコードするポリタンパク質の Vp42 と Vp25 の間に外来遺伝子を導入するため、Vp42/Vp25 間のプロテアーゼ切断部位 Q/G 前後の異なる数のアミノ酸（3～9 個）を反復し、人為的にプロテアーゼ切断認識配列を付加した複数の感染性クローンを構築した。さらに相同組み替えによる外来遺伝子の脱落を防ぐために、反復したプロテアーゼ切断部位 Q/G 前後のアミノ酸配列が変化しないように、コドンの第3番目に変異を導入したクローンも構築し、さらに、GFP 遺伝子を用いて、ウイルスベクターの安定性を調べた。プロテアーゼ切断部位 Q/G 前後の反復アミノ酸数が比較的多いクローン（pER2L10R19GFP、pER2L10R15GFP pER2L5R15GFP）では3代継代接種以後は GFP の蛍光は検出されなくなり、GFP 遺伝子に欠失が生じた。一方、Q/G 前後の反復が5アミノ酸のクローン（pER2L5R5GFP）と pER2mL5mR5GFP（pER2L5R5GFP のコドンの第3番目に変異を導入したクローン）では、9代継代接種後も GFP は安定して発現していた。次に、導入遺伝子のサイズと遺伝子の安定発現との関係を調べた。pER2L10R19、pER2L5R5GFP および pER2mL5mR5GFP にサイズの異なる遺伝子、すなわち ACLSV-MP（1500bp）、GFP（900bp）、ACLSV-CP（700bp）、ACLSV-ΔCP1（450bp）、ACLSV-ΔCP2（300bp）を導入して、*C. quinoa* で継代接種し、導入遺伝子の安定性を調べた結果、ACLSV-MP（1500bp）に関しては、pER2L10R19 で2代目以降、pER2L5R5 で4代目以降、pER2mL5mR5 で6代目以降に遺伝子の脱落が認められた。一方、pER2L5R5GFP および pER2mL5mR5GFP では、GFP（700bp）よりサイズが小さな遺伝子は *C. quinoa* で少なくとも6～9代継代接種しても安定に発現することが明らかになった。以上の結果より、プロテアーゼ切断部位 Q/G 前後の反復アミノ酸数を少なくすることにより、700bp 程度の遺伝子であれば安定的に発現するウイルスベクター（ALSV ベクター）を構築した（Li et al., 2004）。

2) 複数の蛍光タンパク質で可視化したリンゴウイルスの作出とウイルス間相互作用の解析 (図2)

GFP 発現 ALSV ベクター (GFP-ALSV) を植物に接種すると、ウイルスの細胞間移行と全身移行の様子を経時的に観察できると共に、植物の反応 (病徴出現等) とウイルスの存在との関連を明らかにできる (学会発表: 佐々木ら、2004、2005)。果樹類に感染しているウイルスは、ゲノムの塩基配列に多数の変異が蓄積した複数の変異株から構成されている。これら変異株が同一組織内でどのように分布しているかを明らかにする目的で、YFP と CFP で別々にタグした ALSV を植物 (*C. quinoa*) に同時混合接種あるいは時期をずらして接種し、両蛍光の分布を調べた。*C. quinoa* (8 葉期) の第 3~6 葉に同時混合接種した葉では、接種後 3 日 (3dpi) から YFP と CFP の点状蛍光が別々に観察され、その後蛍光はリング状に拡大したが、両蛍光は重なり合わず空間的に分離したままであった。6~7dpi の上葉では、YFP と CFP は別々の葉脈 (主にクラス III と IV) からアンロードし、その後も両蛍光は別々の領域に混じり合うことなく広がった。CFP-ALSV を接種した葉に、時期 (2~6dpi) をずらして YFP-ALSV を接種した場合、YFP の蛍光は CFP 蛍光が広がっていない領域でのみ観察された。特に 6dpi の葉では、YFP スポットの数、mock 接種区の 0~12% であった。以上から 2 種の蛍光タンパク質でタグした ALSV は接種葉および上葉ともに別々に分布し、既にウイルス感染した領域には侵入できないことが明らかになった (学会発表: 菅原ら、2005)。以上の結果は、異なる蛍光タンパク質でタグしたウイルスを用いることにより、リンゴウイルス変異株が植物体内で棲み分けている現象を明らかにした。この蛍光タンパク質標識ウイルスは果樹ウイルス間の相互作用の研究の強力なツールとなる。

3) ALSV ベクターのジーンサイレンシング誘導ベクターとしての利用 (図3)

GFP 発現タバコ (GFP-タバコ) に GFP 遺伝子を導入したリンゴ小球形潜在ウイルス (GFP-ALSV) を接種すると、接種葉では接種後 5 日 (5dpi) から、上葉では 15dpi から GFP 蛍光が消失し始め、やがて葉全体でサイレンシング (VIGS) が誘導されることは既に報告した (学会発表: 山蔦ら、2004)。GFP 発現 *Nicotiana occidentalis* に GFP-ALSV した場合も同様に、接種葉では 4~5dpi から、また上葉では 7dpi から蛍光が消失し始め、14dpi 以降に展開した葉では葉全体で GFP 蛍光は観察されなくなった。GFP 遺伝子の 3' 末端を欠失した DNA 断片を ALSV ベクターに連結してサイレンシング誘導に必要な塩基数を調べたところ、全長 (約 700bp)、300bp、200bp、100bp のいずれでもサイレンシングの速度に差異は認められなかった。接種植物を 20°C、25°C、30°C で生育させて温度の影響を調べた結果、高温 (30°C) でサイレンシング効率が高かった。以上のように、ALSV は *Nicotiana* 属植物で GFP 遺伝子のサイレンシングを効率的に誘導することが明らかになった。次に、植物の endogenous gene のサイレンシングについて検討した。タバコからクローニングした phytoene desaturase (PDS) 遺伝子の一部を ALSV ベクターに導入し、3 種 *Nicotiana* 属植物 (タバコ、*N. occidentalis* および *N. benthamiana*) に接種した。その結果、タバコでは接種後 15 日、*N. occidentalis* では接種後 7 日、*N. benthamiana* では接種後 12 日から上位葉の白色化が生じ、新たに展開する葉は全体が白化した。以上から、ALSV ベクターは transgene gene だけではなく、endogenous gene のサイレンシングも効率よく誘導することが明らかになった (学会発表: 山蔦ら、2005)。現在ジャガイモ X ウイルス (PVX) やタバコ茎えそウイルス (TRV) ベクターが *Nicotiana* 属植物での VIGS に広く利用されているが、ALSV ベクターはこれらと同等か、それ以上効率的に VIGS を誘導するベクターである。この ALSV ベクターは、植物の発熱関連遺伝子や寒冷耐性関連遺伝子の機能解析に利用可能であると共に、果樹 (リンゴ) での VIGS (これまで世界的に例がない) の誘導にも期待される。

来年度研究計画の概略

1. VIGS の誘導や抑制に関わるウイルス側の因子 (サプレッサー) の同定

リンゴウイルス (ALSV および ACLSV) のゲノムにコードされたどの遺伝子が植物の基本的防御機構 (VIGS) のサプレッサーとして機能するかを明らかにする。

2. 同種および異種の果樹ウイルス間の棲み分け機構の解明

2 種の蛍光タンパク質で可視化したリンゴウイルスを用いて、感染植物体内でのウイルスの棲み分け機構を明らかにする。

3. 寒冷地果樹（リンゴ）でのVIGSの誘導

リンゴから分離されたアントシアニン合成酵素（ANS）をALSVベクターに組み込み、これを赤系リンゴに接種することにより、リンゴでのVIGSの誘導を試みる。

本研究拠点形成に関連して受けた研究助成（助成金名称および金額）

科学研究費（基盤研究（B））2,700千円

遺伝子組換え技術を応用した次世代型植物の開発に関する研究（（独）農業生物資源研究所）3,600千円

研究成果

原著論文

Isogai, M. and Yoshikawa, N. 2005. Mapping the RNA-binding domain on the Apple chlorotic leaf spot virus movement protein. *J. Gen. Virol.* **86**:225-229.

Isogai, M., Aoyagi, J., Nakagawa, M., Kubodera, Y., Satoh, K., Katoh, T., Inamori, M., Yamashita, K. and Yoshikawa, N. 2004. Molecular detection of five cherry viruses from sweet cherry trees in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* **70**:288-291.

Li, C., Sasaki, M., Isogai, M. and Yoshikawa, N. 2004. Stable expression of foreign proteins in herbaceous and apple plants using Apple latent spherical virus RNA2 vectors. *Arch. Virol.* **149**:1541-1558.

井手洋一, 黒木健児, 田代暢哉, 馬籠洋, 吉川信幸, 大島一里. 2004. カンキツに発生するリンゴステムグルーピングウイルスの大腸菌発現外被タンパク質に対する抗血清の作製と酵素結合抗体法による診断への利用. *日本植物病理学会報* **70**:123-127.

国内学会発表

菅原智彦, 山蔦翼, 李春江, 磯貝雅道, 吉川信幸. 2005. 2種の蛍光タンパク質（YFPおよびCFP）でタグしたリンゴ小球形潜在ウイルス（ALSV）の混合接種植物における分布. 平成17年度日本植物病理学会大会.

磯貝雅道, 吉川信幸. 2005. リンゴクロロティックリーフスポットウイルスとブドウえそ果ウイルスの細胞間移行タンパク質間のインターアクションと細胞間移行阻害. 平成17年度日本植物病理学会大会.

佐々木伸浩, 山蔦翼, 李春江, 磯貝雅道, 吉川信幸. 2005. GFPを発現するリンゴ小球形潜在ウイルスに感染した *Chenopodium quinoa* 葉における GFP 蛍光の消長. 平成17年度日本植物病理学会大会.

山蔦翼, 五十嵐亜紀, 佐々木伸浩, 李春江, 磯貝雅道, 吉川信幸. 2005. リンゴ小球形潜在ウイルスによる *Nicotiana* 属植物でのジーンサイレンシングの誘導. 平成17年度日本植物病理学会大会.

磯貝雅道, 吉川信幸. 2005. リンゴクロロティックリーフスポットウイルス細胞間移行タンパク質の核酸結合特性. *日本植物病理学会報* **71**:45-46.

八重樫元, 李春江, 田山堅, 磯貝雅道, 佐野輝男, 吉川信幸. 2005. リンゴクロロティックリーフスポットウイルス分離株間で保存された外被タンパク質アミノ酸配列の部位特異的突然変異解析. *日本植物病理学会報* **71**:46.

佐々木伸浩, 李春江, 磯貝雅道, 吉川信幸. 2005. GFPを発現するウイルスベクターを用いたリンゴ小球形潜在ウイルスの細胞間および長距離移行の解析. *日本植物病理学会報* **71**:49.

五十嵐亜紀, 高橋信子, 磯貝雅道, 吉川信幸. 2005. リンゴ小球形潜在ウイルス細胞間移行タンパク質による GFP 細胞間移行の促進. *日本植物病理学会報* **71**:49.

山蔦翼, 佐々木伸浩, 李春江, 磯貝雅道, 吉川信幸. 2005. リンゴ小球形潜在ウイルスによるタバコでのジーンサイレンシングの誘導. *日本植物病理学会報* **71**:49-50.

渡邊健太郎, 磯貝雅道, 吉川信幸. 2005. リンゴ小球形潜在ウイルス細胞間移行タンパク質の感染植物からの検出とその一本鎖核酸結合能. *日本植物病理学会報* **71**:50.

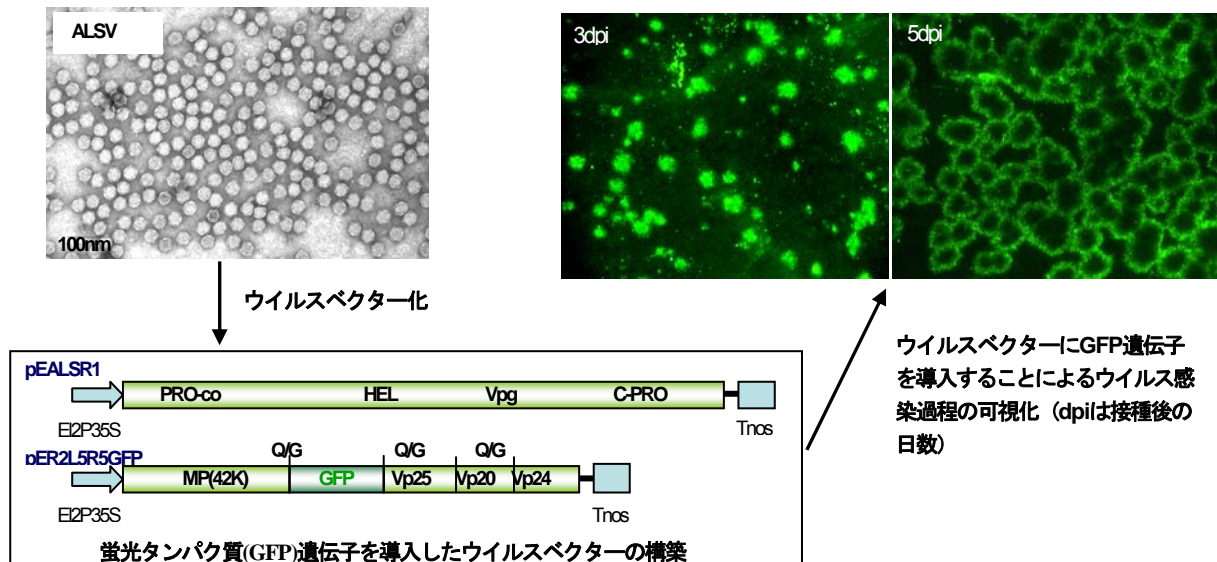


図1 リンゴ小球形潜在ウイルス(ALSV) の遺伝子安定発現型ウイルスベクターの開発

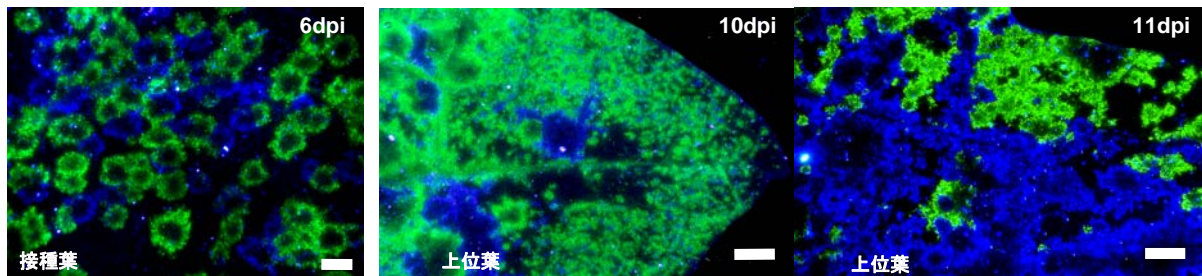


図2 異なる蛍光タンパク質 (YFPとCFP) で標識したALSVの棲み分け現象

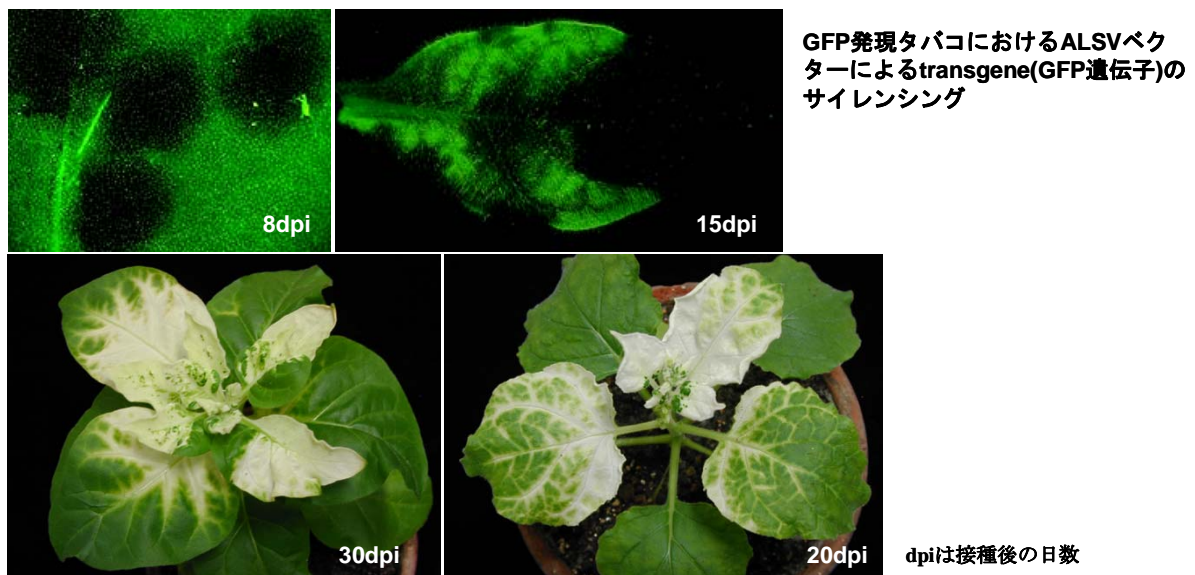


図3 ALSVベクターを用いた植物でのジーンサイレンシングの誘導