



Title	Brassica rapaのTurnip mosaic virusに対する全身えそ誘導遺伝子の解析及びアスコルビン酸を介したウイルス抵抗性の誘導機作の解明 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	藤原, 綾香
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第11389号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/55889
Rights(URL)	http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Ayaka_Fujiwara_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称： 博士（農学）

氏名 藤原綾香

学位論文題名

Brassica rapa の *Turnip mosaic virus* に対する全身えそ誘導遺伝子の解析及び アスコルビン酸を介したウイルス抵抗性の誘導機作の解明

1) *Brassica rapa* 作物の *Turnip mosaic virus* に対する抵抗性遺伝子座 *Rnt1* のえそ病徴誘導への関与
ハクサイ、カブなどの *B. rapa* 作物において *Turnip mosaic virus* (TuMV) による感染は著しい被害をもたらす。TuMV が全身感染した場合えそやモザイクといった病徴が現れるが、特にえそが発症するとその個体は枯死に至る。こうしたウイルス病の防除方法として、抵抗性遺伝子の導入、病徴軽減のための耐性遺伝子の付与、農薬の利用などが考えられるが、抵抗性についてはこれを打破するウイルス系統の出現が常に問題となる。一方、病徴発現に関わる宿主側の要因は不明な点が多く、またウイルスに対して効果のある農薬はほとんど開発されていない。本研究では、まず TuMV に対する抵抗性遺伝子とえそ病徴誘導遺伝子との関係を明らかにし、*B. rapa* 作物における TuMV 抵抗性育種の方向性を検討した。

TuMV-UK1 系統をハクサイ・カブ品種に接種すると高度抵抗性、シビアなえそ、マイルドなえそ及びモザイクなど多様な反応が観察された。ハクサイ品種「秋まさり」は UK1 に対して高度抵抗性を示したが、この抵抗性は UK1 の突然変異により打破され、全身えそを示した。さらに、この UK1 の突然変異系統 UK1m を上記 3 種類の病徴を示す品種に接種すると、いずれも病徴がモザイクに変化した。これらの結果から、TuMV 感染による病徴のタイプは、宿主とウイルス双方がもつ因子の組合せによって決定されていると考えられた。そこで、まず宿主側の因子を同定するため交雑実験を行い、えその誘導には一個の不完全劣性遺伝子が関与していることを明らかにした。次に、「秋まさり」の高度抵抗性遺伝子を同定し、この抵抗性遺伝子とえそ誘導遺伝子との対立性を調べたところ、同座の遺伝子である可能性が高いと考えられた。そこで、この遺伝子座を *Rnt1* (Resistance and necrosis to TuMV) と命名した。この遺伝子座には 3 種類の複対立遺伝子が存在しており、*Rnt1-1* は UK1 に対して高度抵抗性、*rnt1-2* はえそ、*rnt1-3* はモザイクを誘導する。次に、ウイルス側の因子を同定するため、突然変異系統 UK1m のゲノム配列を明らかにし UK1 と比較した。その結果、ゲノム中に 3 箇所の非同義置換が見つかった。Site-directed mutagenesis によりそれぞれの変異を含む UK1 の感染性クローンを作成し感染性試験を行ったところ、CI 遺伝子における V1827E 変異が全ての病徴変化と抵抗性の打破に関与していることが明らかとなった。このようにえその誘導には抵抗性遺伝子座 *Rnt1* の複対立遺伝子の一つ *rnt1-2* が関わっており、抵抗性遺伝子 *Rnt1-1* そのものも TuMV の非病原性遺伝子である CI の変異によってえそを誘導するようその表現型が変化する。従ってえその発症を防ぐためには *Rnt1-1* あるいは *rnt1-2* を育種の過程で除く方がよいと考えられたため、それらの選抜を効率化するための DNA 多型マーカーの設計を試み、第 6 染色体上に組換え価 0% で連鎖する indel PCR マーカー-129-center を作成した。

2) *Rnt1-1*による TuMV 抵抗性と連動したアスコルビン酸蓄積量の増加とその誘導機作

植物細胞内で抗酸化物質などとして働くアスコルビン酸 (AsA) には、ウイルスが宿主の RNA サイレncingを抑制するために産生する RNA サイレncing サプレッサーの機能を阻害する作用のあることが *in vitro* の実験より明らかにされている。植物がウイルスに対する防御反応として AsA の蓄積誘導を行っているかどうか *B. rapa* と TuMV の系において調べたところ、「秋まさり」における *Rnt1-1* による抵抗性と連動して接種後 3 日目から総 AsA 量が 50%程度増加することが認められた。このレベルの総 AsA 量の増加がどの程度ウイルス耐性に寄与するのか明らかにするため、アラビドプシスにおいて総 AsA 量が野生型に比べて約 30%増加するアスコルビン酸オキシダーゼ (*ao*) 変異体のウイルス耐性について調べたところ、*ao* 変異体では野生型に比べウイルス蓄積量が ELISA 値で約 20%有意に減少した。この結果から 50%前後の総 AsA 量の増加によってウイルス耐性は増大すると考えられた。すなわち、*Rnt1-1* 抵抗性と連動して生じる AsA 量の増加はウイルスに対する防御反応であることが示唆された。そこで、その誘導経路を明らかにする目的でまず TuMV-UK1 を接種した「秋まさり」において AsA 合成及びその酸化・還元経路上の遺伝子の発現量の変化を定量 RT-PCR によって解析した。合成経路上の遺伝子では *VTC4* や *GLDH* など一部の遺伝子で発現量が減少したものの、増加する遺伝子は認められなかった。一方、接種後 3 日目において AsA の酸化に関わる *APX4* や *tAPX* 遺伝子の発現量は約 40%減少し、酸化型 AsA であるデヒドロアスコルビン酸 (DHA) を AsA に還元する *DHAR1* 遺伝子の発現量は約 30%増加した。また、APX や DHAR の酵素活性を測定したところ酵素活性レベルでも同様な結果が得られた。次に、この AsA 酸化経路の抑制、DHA 還元経路の促進を制御するシグナル物質を同定するため、抵抗性誘導シグナルとして報告されている H_2O_2 、サリチル酸 (SA)、ジャスモン酸メチル (MeJA)、アブシジン酸 (ABA) による各処理を「秋まさり」に行って、APX や DHAR などの挙動を調べた結果、MeJA に対する反応パターンが TuMV-UK1 のものと一致した。さらに、TuMV-UK1 接種後の「秋まさり」における SA、JA 類縁体及び ABA 蓄積量と AsA 蓄積量の推移を比較したところ、JA 類縁体の蓄積量の増加のタイミングが AsA のものと一致した。以上の結果から、*Rnt1-1* 抵抗性と連動した総 AsA 量の増加は JA シグナルを介して誘導される防御反応であることが明らかとなった。

3) *Brassica rapa* 作物と TuMV の系におけるアスコルビン酸の抗ウイルス剤としての効果

B. rapa では TuMV に対する防御反応の一つとして AsA の蓄積を誘導していることから、AsA を TuMV に対する抗ウイルス剤として利用できる可能性が考えられた。そこで、AsA の抗ウイルス剤としての効果を明らかにするため、黄色蛍光タンパク (YFP) を生産する TuMV 感染性クローン (TuMV-TuR1-YFP) を用いた半葉法及び葉挿し法による検定法を確立し、AsA 誘導体である水溶性の L(+)-アスコルビン酸 2-硫酸エステル二ナトリウム二水和物 (AsA-SO₄)、脂溶性のアスコルビン酸パルミチン酸エステル (AsA-Pal) 及び DHA の抗ウイルス作用を評価した。半葉法により各処理のウイルス感染点数への影響を調べたところ、AsA-SO₄ 20 mM 処理で 45%、AsA-Pal 20 mM 処理で 32%、DHA 20 mM 処理では 70%感染点数が減少した。また、ウイルス接種後、葉挿し法により AsA-SO₄ 20 mM 溶液を吸収させたところ感染点数で 70%減少した。以上の結果から、AsA は抗ウイルス剤として有効であること、また植物組織内への浸透性を高めることでさらに効果を上げられる可能性があることが明らかとなった。