



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 [全文の要約]
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	<a href="http://hdl.handle.net/2115/55890">http://hdl.handle.net/2115/55890</a>
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。
Note(URL)	<a href="https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/">https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/</a>
File Information	Ayaka_Fujiwara_summary.pdf



[Instructions for use](#)

# 学位論文内容の要約

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

*Turnip mosaic virus* (TuMV) が *B. rapa* 作物であるハクサイやカブに感染するとモザイクやえそといった病徴の発現を誘導し大きな被害をもたらす。モザイクは早期に発現すると結球が阻害されその影響が大きく現れるものの、中後期に発現した場合は収量や品質への影響は小さい。一方、えその場合は早期に発現すると個体は枯死に至るため大幅な減収となる。また、中後期の発現であってもえそを生じた部分はハクサイ軟腐病菌に感染しやすいため圃場や輸送中の腐敗の原因となる。こうした TuMV 感染による被害を抑えるための防除方法はいくつか考えられるが、植物ウイルスに対する効果的な農薬はほとんど開発されておらず、媒介昆虫であるアブラムシに対する防除もその効果は十分ではない。これまでに抵抗性遺伝子の導入も図られてきたが、同定されている遺伝子は限られており、抵抗性を打破するウイルス系統の出現が常に問題となる。そのため、TuMV に対する抵抗性育種を考える場合は感染をいかに食い止めるかだけでなく、感染した場合にいかに被害を最小限に食い止めるかといった観点からの耐性付与あるいは病徴の制御を目的とした育種が必要であると考えられる。特に、えそ病徴の発現を抑制することは重要であるため、本論文ではまず 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、ハクサイ・カブにおける TuMV 抵抗性育種の方角性を検討した。次に、TuMV に対するハクサイの高度抵抗性に連動して抗ウイルス作用のあるアスコルビン酸が蓄積するメカニズムを明らかにし、その上で、アスコルビン酸の抗ウイルス剤としての効果について検討を行った。

## 1) *B. 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

ハクサイやカブで TuMV 感染によりえそが生じると、前述したような収量・品質の大幅な低下をもたらす。ハクサイ・カブと同じアブラナ科の *Arabidopsis thaliana* では TuMV 感染により生じるえそが宿主側の因子により誘導される過敏感細胞死様の細胞死であることがすでに報告されている。そこで、ハクサイ・カブでも宿主側の因子によってえそが誘導される可能性を考え、TuMV-UK1 系統に対するハクサイ・カブ数品種の反応を調べた。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持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 1 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 か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。したがって、えその発現を防ぐためには *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

染色体上に組換え過 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の増加とその誘導機作

アスコルビン酸 (AsA) は植物細胞内に比較的多量に存在し、抗酸化物質や還元剤として働くほか、酵素の cofactor、細胞の分化や伸長の調節など多くの機能を持つことが知られている。特に抗酸化物質としての働きは重要で、低温や傷害といった活性酸素が生じる非生物学的ストレスを受けた場合には AsA の蓄積が誘導される。トマトやピーマンでは弱毒キュウリモザイクウイルスの感染といった生物学的ストレスを受けた場合にも AsA の蓄積量が 30-40%程度増加するが、弱毒ウイルスの感染によって活性酸素が生じるという報告はなく、ウイルス感染によって AsA の蓄積が誘導されることの生物学的な意味については明らかになっていない。しかし、最近になって AsA 誘導体に植物のウイルスに対する防御機構である RNA サイレンシングを間接的に活性化する作用があることが明らかになったことから、植物のウイルスに対する防御機構の一つとしてウイルス感染後 AsA の蓄積が誘導されるのではないかと考えられた。そこで、本研究ではこの点について *B. rapa* と TuMV の系を用いて検証を行った。その結果、「秋まさり」における *Rnt1-1*による抵抗性と連動して接種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%程度の総 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 *DHARI* 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、サリチル酸 (SA)、ジャスモン酸メチル (MeJA) 及びアブシジン酸 (ABA) による各処理を「秋まさり」に行い、APX や DHAR などの挙動を調べた。その結果、MeJA に対する反応パターンが TuMV-UK1 接種の際のパターンと一致した。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抗ウイルス作用のある 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-SO<sub>4</sub>)、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-SO<sub>4</sub> 20mM 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-SO<sub>4</sub> 20 mM 溶液を吸収させたところ感染点数が 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。しかしここで、AsA の抗ウイルス作用が実際に Shimura et al. (2008) の論文で示唆されたように RNA サイレンシングと関連があると考えてよいのか、*in vivo* の実験では証明されていない。そこで、サイレンシングに必要な DCL 2 及び 4 が欠損しサイレンシング能が低下した *dcl2/dcl4* 変異体において、AsA が抗ウイルス性を示すかどうか確かめる実験を行った。野生型では TuMV 接種後 6 日目から全身感染し

始めるが、DHA を処理すると全身感染が 1 日遅れた。一方、*dcl2/dcl4* 変異体では DHA を処理しても効果が現れなかった。このことから、DHA は RNA サイレンシングと関連して抗ウイルス性を示すことが強く示唆された。