HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| 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 |
| Author(s) | 藤原, 綾香 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(農学) |
| Dissertation Number | 甲第11389号 |
| Issue Date | 2014-03-25 |
| DOI | https://doi.org/10.14943/doctoral.k11389 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/63707 |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Ayaka_Fujiwara.pdf |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

# *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

北海道大学　大学院農学院

生物資源科学専攻　博士後期課程

藤原　綾香

目次

**第1章　緒言** … **1**

**第2章　研究史** … **5**

**第3章　*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**

背景及び目的 … **20**
材料と方法 … **22**
結果 … **29**
TuMV-UK1 に対する *B. rapa* の病徴誘導因子
TuMV-UK1 の病徴誘導因子
考察 … **39**

**第4章　*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**

背景及び目的 … **42**
材料と方法 … **46**
結果 … **54**
*Rnt1-1* 抵抗性と連動したアスコルビン酸蓄積量の増加
アスコルビン酸含量とウイルス耐性との関係
*Rnt1-1* 抵抗性と連動したアスコルビン酸蓄積誘導の機作
考察 … **71**

**第5章　*Brassica rapa* 作物における TuMV に対するアスコルビン酸の抗ウイルス剤としての効果**

背景及び目的 … **78**
材料と方法 … **80**
結果 … **82**
アスコルビン酸の抗ウイルス効果解析法の確立
アスコルビン酸誘導体及び酸化型アスコルビン酸の抗ウイルス効果
*Arabidopsis* の *dcl2/dcl4* 二重変異体における DHA の抗ウイルス効果

考察 … 93

**第6章　総合考察** … **95**

**引用文献** … **100**

**摘要** … **111**

**謝辞** … **117**

## 第1章　緒言

植物ウイルスの感染による病気の発生を化学農薬や栽培法により制御することは困難である。最もよく行われる防除法は作物への抵抗性遺伝子の導入であり、抵抗性を誘導する多くの優性又は劣性遺伝子が見つかっている（Bruening 2006）。しかし、このような抵抗性遺伝子を用いるにはいくつかの問題がある。一つは、単一の遺伝子による抵抗性はウイルスの変異によって打破されやすいため（Lecoq et al. 2004）、どのようにしてこの抵抗性を維持するのかという点である。また、植物とウイルスの組合せによっては抵抗性の遺伝資源が非常に限られる場合もあり（Walsh et al. 1999）、これらのことから考えると、ウイルスに対して完全な抵抗性を持たせるよりもウイルス感染による病徴を抑えて病害による損失を最低限に抑えるという方法のほうがより現実的であると考えられる。

カブモザイクウイルス（*Turnip mosaic virus*, TuMV）によるウイルス病は世界各国で発生している。モモアカアブラムシやダイコンアブラムシをはじめとする、少なくとも 89 種の昆虫により非永続的に伝搬される。その宿主範囲は広く、アブラナ科の他キク科、アカザ科、ナデシコ科及びナス科など 20 科もの植物に感染し、世界中で感染が確認されている（Walsh and Jenner 2002）。キュウリモザイクウイルス（*Cucumber mosaic virus*, CMV）に次いで重要な植物ウイルスとされ、特にアジア、北アメリカ、ヨーロッパで *Brassica* 作物に被害を及ぼしている。病徴はえそ条斑、退緑斑紋、えそ斑紋、葉の奇形、植物体の萎縮など様々である。ハクサイ（*B. rapa* subsp. *pekinensis*）においては、えそ病徴が早期に発現すると大幅な減収となり被害は大きく、発病株は *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* にも感染しやすくなる。モザイクも早期に発現すると結球しなくなるため被害が大きいが（土崎ら 1993）、中後期に発現した場合はえそに比べると収量・品質に対する影響は小さい。TuMV による多様な病徴はウイルス系統及び品種の

組合せや、環境要因も関与している。一般に、低温でえそ条斑を生じ、高温ではモザイクを生じやすい傾向にある。また、圃場では CMV との重複感染も検出され、その場合には病徴が激しくなる。TuMV の防除法として、媒介昆虫であるアブラムシの防除が挙げられるが、その効果は十分ではない。その他の防除法として、抵抗性遺伝子の導入が挙げられるが、ハクサイの TuMV に対する抵抗性遺伝子は *TuRB01b*（TuMV Resistance in Brassica 01）、*retr01*（recessive TuMV resistance 01）、*retr02* 及び *ConTR01*（Conditional TuMV Resistance 01）（Qian et al. 2013; Rusholme et al. 2007; Walsh and Jenner 2006）の 4 遺伝子しか報告がない。*TuRB01b* は *B. napus* が持つ抵抗性遺伝子 *TuRB01* のホモログであると推定されているが、*TuRB01b* は非病原性遺伝子である TuMV の CI 遺伝子の変異によって抵抗性が打破されてしまう（Jenner et al. 2000; Walsh et al. 1999; Walsh et al. 2002）。一方、*retr01* と *ConTR01* は組み合わせることによって比較的広範な TuMV 系統に対して抵抗性を示すことが報告されている（Rusholme et al. 2007）。*retr02* は、TuMV-C4 系統対して抵抗性を示すが、そのほかの系統について議論されていない（Qian et al. 2013）。このように利用できる抵抗性遺伝子は限られているため、ウイルスの変異による抵抗性の崩壊を前提として、感染後の病徴をいかに軽減させるか考えた育種を進める必要があるのではないかと考えられる。そのためには TuMV 感染による多様な病徴がどのように誘導されるのか、そのメカニズムを知る必要があるが、それについて十分な知見を得られていないのが現状である。そこで第 3 章では TuMV に感染したハクサイの病徴誘導機構を明らかにすることを目的に、抵抗性、えそ病徴及び葉の奇形誘導に関する遺伝子の遺伝学的な関係を明らかにするとともに、抵抗性及びえそ病徴の誘導に関わる遺伝子座の fine mapping を行った。さらに、ハクサイにおけるえそ病徴の誘導に関わる TuMV の非病原性遺伝子の同定も試みた。

病原体に対する防除を考えるとき、圃場では農薬を用いるのが一般的である。しかし、ウイルスは宿主が持つゲノム転写・翻訳機構を利用して自身を増殖することから、ウイ

ルスの増殖だけを抑制するのに効果的な農薬はほとんど開発されていない。しかしウイルスに感染した植物はただそのままウイルスの増殖を許すのではなく、RNA サイレンシングという防御機構によってウイルスの増殖に対抗している。ウイルスが植物体内で増殖する際、ウイルス自身がコードする複製酵素により複製中間体としてウイルスの dsRNA が生成される。この dsRNA は dsRNA 特異的分解酵素である Dicer 様タンパク質（DCL）によって 21～24 ヌクレオチド（nt）の small interfering RNA（siRNA）に切断される。siRNA は RISC（RNA-induced silencing complex）と呼ばれるタンパク質複合体に取り込まれ、そこで 1 本鎖 RNA にほどかれる。RISC は保持する siRNA 鎖に相補的な RNA 配列を認識し、RISC を構成するスライサータンパク質 AGO（Argonaut）によってその相補的な RNA 配列、つまりウイルス RNA を切断し、ウイルスの増殖を抑制している。これに対してウイルスもカウンター攻撃として RNA サイレンシングサプレッサー（RSS）を産生する。RSS を siRNA、DCL または AGO などに結合させることで RNA サイレンシング機構を阻害し、ウイルス RNA の切断・分解を阻害している。植物ウイルスの感染は、この攻防の上に成り立っている。Shimura et al.（2008）は、*in vitro* の実験からアスコルビン酸（ascorbate acid, AsA）にはウイルス RSS と siRNA が結合するのを阻害する効果があることを見出した。AsA により RSS の機能が阻害されると、RNA サイレンシングが抑制されないため、植物のウイルス防御機構が阻害されない。つまり、AsA に抗ウイルス効果があることを見出した。AsA は植物細胞内に比較的多量に存在し、抗酸化物質あるいは還元剤として働くほか、酵素の cofactor 及び細胞の分化や伸長の調節を担う物質、また、シグナル伝達物質として機能することが報告されており（Gallie 2013a）、その細胞内の濃度は多様な制御をうけていると考えられる。そこで第 4 章では、まず第 3 章で用いた材料を用いて、*B. rapa* が TuMV の感染に応答して抗ウイルス物質である AsA の蓄積を誘導するのか調べた。その結果、抵抗性を示す組合せで 50%程度 AsA の蓄積量が増加するのが認められたため、さらにこの抵抗性と連

動した AsA 蓄積量の誘導メカニズムについて詳細な解析を行った。

先述したように現在 TuMV を含め植物ウイルスに有効な薬剤はほとんど開発されていないが、Shimura et al.（2008）による報告及び本研究第 4 章の結果から AsA が TuMV に対する抗ウイルス剤として有効である可能性が示唆された。そこで第 5 章では、AsA の抗ウイルス剤としての効果を検証する目的でまずその検定方法を確立し、その上でより効果の安定した AsA 誘導体の評価などを行った。

本論文の第 6 章では、以上の研究結果に基づいて *Brassica* 作物における TuMV による病害の防除において病徴制御の面からの育種が重要であることを議論する一方、抗ウイルス作用を示す AsA の蓄積誘導という新たに見出された TuMV に対する *Brassica* 作物の防御メカニズムについて、さらにはそれらの知見に基づいた農薬としての AsA の可能性について考察した。

## 第 2 章　研究史

### 1. カブモザイクウイルス（*Turnip mosaic virus*, TuMV）

#### (1) TuMV のゲノム構造

TuMV はポティウイルス科ポティウイルス属の一本鎖（+）RNA ウイルスである。約 10kb のゲノムを持ち、5'末端には共有結合により VPg (viral protein genome-linked) が結合し、3'末端はポリ A 配列となっている。単一の ORF にはポリプロテインがコードされており、翻訳と同時または翻訳後にウイルス自身から産生されるプロテアーゼによって切断されて P1, HC-Pro (helper component-proteinase), P3, 6K1, CI (cylindrical inclusion), 6K2, NIa (nuclear inclusion a), NIb (nuclear inclusion b) 及び CP (coat protein) の各タンパク質が生産される（Walsh and Jenner 2002）。以下、各タンパク質の機能について述べる。

① P1 タンパク質

ウイルスの増殖や移行に関与するほか（Klein et al. 1994; Verchot and Carrington 1995a, b）、一本鎖及び二本鎖の RNA に非特異的に結合する能力を持ち、HC-Pro との複合タンパク質の状態で宿主植物の転写後ジーンサイレンシングのサプレッサーとして機能する（Kasschau and Carrington 1998）。P1 自身の C 末端側にあるヒスチジン、アスパラギン酸、セリンの 3 アミノ酸を認識して自身をポリプロテインから切断するプロテアーゼの機能も持つ（Riechmann et al. 1992）。

② HC-Pro

HC-Pro は複数の機能を持つタンパク質である（Maia et al. 1996）。N 末端側の領域には特定のウイルス粒子をアブラムシの口針に留める機能を持ち、アブラムシによるウイルス伝播の特異性を制御するドメインが存在する（Wang et al. 1998）。また、中央の領

域はウイルスゲノムの増殖や全身移行に関与しており（Cronin et al. 1995）、この領域には 2 つの RNA 結合ドメインが存在する（Burd and Dreyfuss 1994; Nagai 1996）。サプレッサーとしての機能や（Anandalakshimi et al. 1998; Brigneti et al. 1998; Kasschau and Carrington 1998）、Potyvirus の混合感染における病徴の深刻化、ウイルスの蓄積にも関与している（Pruss et al. 1997; Vance et al. 1995）。C 末端側の領域には自身の C 末端を切断するプロテアーゼとしての機能も有する（Maia et al. 1996）。原形質連絡の size exclusion limit（SEL）の増大にも関与している（Rojas et al. 1997）。

③ P3 タンパク質

P3 に変異を導入した研究により、P3 はウイルスの複製に関与することが明らかとなっている（Klein et al. 1994）。P3 は RNA 結合活性を持たないため（Merits et al. 1998）、ウイルスの複製に関与するためには CI との相互作用が必要となる（Rodrifuez-Cerezo et al. 1993）。実際、P3 が細胞質に局在し、CI タンパク質の構造が形成される初期段階から両者が結合していることが確認されている（Rodrifuez-Cerezo et al. 1993; Langenberg and Zhang 1997）。TuMV における研究により、P3 が病徴決定に関与していることが明らかとなっている（Jenner et al. 2002, 2003）。

④ 6K1 タンパク質

6K1 は通常 P3 タンパク質と結合している。*Plum pox virus* のこの複合体における変異体を用いた研究により、これらは病徴決定に関与していることが明らかとなっている（Saenz et al. 2000）。

⑤ CI タンパク質

CI は ATPase 活性や、RNA ヘリカーゼとしての活性を持ち（Lain et al. 1990, 1991）、

ウイルスの複製に関与している（Chen et al. 1994）。他にも NTP との結合、NTPase 活性、RNA との結合などの報告があり、上流には RNA 結合ドメインが存在する（Fernandez et al. 1995; Lain et al. 1990, 1991）。また、感染細胞の原形質連絡においても ATPase 活性を示し、ウイルスの細胞間移行にも関与している（Chen et al. 1994）。TuMV における研究により、CI が病徴決定に関与していることも明らかとなっている（Jenner et al. 2000, 2002）。

⑥ 6K2 タンパク質

6K2 の中央に位置する疎水性ドメインを介して小胞体から生じる小胞と結合し、さらに複製に関わるタンパク質を小胞体膜上に固定させる働きによりゲノムの増殖に関与している（Schaad et al. 1997）。この際、VPg や NIa などと複合体を形成して働くと考えられている。

⑦ NIa タンパク質

NIa は N 末端側の VPg ドメインと C 末端側のプロテアーゼドメインの二つのドメインを持つ。また、核局在シグナルとしての機能を持つことが報告されている（Hajimorad et al. 1996; Martin et al. 1992）。VPg ドメインはウイルスの複製と宿主の遺伝子型に対する特異性に関して重要な役割を果たしている（Riechmann et al. 1992; Merits et al. 1998）。また、タンパク質同士の相互作用にも関与しており、VPg と宿主の eIF4E との相互作用はウイルスの複製にとって重要である（Andino et al. 1999）。プロテアーゼドメインは自身だけでなく他のタンパク質のポリプロテインからの切断も担っている（Kim et al. 1998）。

⑧ NIb タンパク質

NIb は 2 つの独立した核局在シグナルを有している（Li et al. 1997）。また、NIb タンパク質は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとしての機能を持つ（Hong and Hunt 1996）。NIa の VPg ドメインやポリメラーゼドメインとの結合や NIb と宿主のポリ A 結合タンパク質との相互作用が報告されているが（Hong et al. 1995; Fellers et al. 1998; Li et al. 1997, Daros et al. 1999）、これらのウイルス増殖との関与は明らかにされていない（Wang et al. 2000）。

⑨ CP タンパク質

CP は大まかに 3 つのドメイン N 末端、Core、C 末端に分けることが出来る。HC-Pro と CP の複合体はアブラムシによるウイルス伝播に重要な働きをする（Pirone and Blanc 1996）。HC-Pro と CP はそれぞれ移行タンパク質であり、原形質連絡の排除分子量限界を増大させることでウイルス RNA の細胞間移行を促進している（Rojas et al. 1997）。CP の Core 領域はウイルスの細胞間移行に、N 末端及び C 末端側は全身移行に関与している（Dolja et al. 1994）。また、CP の Core 領域はタンパク質同士の結合やタンパク質と RNA の結合に関与しており、これらは非ビリオン複合体の形成に関与している（Fedorkin et al. 2000）。他にも、Core 領域はウイルス RNA のカプシドタンパクによる被覆に関与している。CP と NIb の相互作用によってウイルス RNA 合成を制御している（Hong et al., 1995）。さらに、ウイルスや宿主の因子と相互作用する CP の特異的な高次構造体の形成が、リボソーム系により活性化されていることを示唆する報告もある（Mahajan et al. 1996）。この高次構造体によってウイルスゲノムの増殖が増大すると考えられている。

(2) TuMV の伝搬様式と宿主範囲

TuMV は、モモアカアブラムシやダイコンアブラムシをはじめとする、少なくとも 89 種の昆虫により非永続型に伝搬される。その宿主範囲は広く、アブラナ科をはじめとして 20 科の植物に感染し、世界中で感染が確認されている（Walsh and Jenner 2002）。CMV に次いで、2 番目に重要な植物ウイルスとされ、特にアジア、北アメリカ、ヨーロッパでは *brassica* 作物において被害を及ぼしている。

(3) TuMV 感染による病徴

TuMV がダイコン、キャベツ、ハクサイ、カブなどの *Brassica* 植物に感染すると、モザイク病やえそモザイク病などを引き起こす。えそモザイク病では葉脈にえそ条斑、葉脈間には黒褐色の斑点や輪点を多数生じる。ハクサイにおいては、えそモザイクが早期に発病すると大幅な減収となるため被害が大きく、発病株は *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* にも感染しやすくなる。モザイク病も早期に発病すると結球しなくなるため被害が大きいが（土崎ら 1993）、中後期に発病した場合はえそモザイク病に比べると収量・品質に対する影響は小さい。TuMV による多様な病徴は、TuMV 系統の違いや品種による違いのほか、温度条件などの環境要因も関与している。一般に、低温でえそ条斑を生じやすく、高温ではモザイクを生じやすい傾向が認められている。また、圃場では CMV との重複感染も検出されており、重複感染では一般に病徴が激しくなる。

(4) TuMV に対する *Brassica* 植物の抵抗性遺伝子

TuMV に対する抵抗性遺伝子についてはアブラナ（*B. napus*）で多くの報告がある。アブラナで最初に同定された抵抗性遺伝子として、数種類の TuMV 系統に高度抵抗性（extreme resistance）を示す優性遺伝子 *TuRB01* があり、これは A ゲノムの染色体 N6 上に座上している（Walsh et al. 1999）。アブラナは複 2 倍体で A ゲノムと C ゲノムを持

っており、A ゲノムはカブやハクサイが含まれる *B. rapa*、C ゲノムはキャベツが含まれる *B. oleracea* 由来であると考えられている。*TuRB01* は進化の過程で *B. rapa* から受け継がれた遺伝子であることが示唆される。*TuRB02* は TuMV-CHN1 に対する感受性の程度に関する遺伝子として C ゲノムの N14 染色体に座上する（Walsh et al. 1999）。*TuRB03* は *TuRB01* と同様、A ゲノムの染色体 N6 上に座上する単一優性抵抗性遺伝子である（Hughes et al. 2003）。これらの遺伝子はいずれもマッピングはされているものの、その単離・同定はなされていない。また、マッピングはされていないが、交雑の結果から抵抗性遺伝子 *TuRB04* 及び *TuRB05* の存在が示唆されている（Jenner et al. 2002）。これらの遺伝子は互いに独立であり、*TuRB05* に対して *TuRB04* が上位に働く。*TuRB04* は高度抵抗性を誘導し、*TuRB05* は過敏感反応（HR）を誘導した。

ハクサイが持つ抵抗性遺伝子として、上述した *TuRB01* のハクサイホモログとされる *TuRB01b* の報告がある（Rusholme 2000）。また、複数の TuMV 系統に対する抵抗性遺伝子として劣性抵抗性遺伝子 *retr01* と優性抵抗性遺伝子 *ConTR01* があり、前者は後者に対して上位に働く（Rusholme et al. 2007）。*retr01* は染色体 R4 上に、*ConTR01* は染色体 R8 上にマッピングされているがその単離・同定はされていない。このほかにも、劣性抵抗性遺伝子 *retr02* が遺伝学的に同定さている。これについては、マッピングによる座上領域の特定と、*Arabidopsis thaliana* の TuMV 劣性抵抗性遺伝子との相同性解析の結果から染色体 A04 上の *Bra035393* が候補遺伝子とされている（Qian et al. 2013）。

(5) TuMV の非病原性遺伝子

抵抗性を打破する TuMV 変異体を用いて、各抵抗性遺伝子に対するウイルスの非病原性遺伝子の同定がいくつかなされている。*TuRB01* に対する非病原性遺伝子として CI が報告されている（Jenner et al. 2000）。*TuRB03* に対しては P3 の報告があり（Jenner et al. 2003）、*TuRB04* に対しても P3 であることが報告されているが（Jenner et al. 2002）、これ

らはそれぞれ異なるアミノ酸位置での変異により抵抗性を打破する。また、*TuRB05* に対する抵抗性は TuMV の CI における T5447C という塩基の変異により打破されるが、同一の塩基変異を導入した感染性クローンを *TuRB01* を有するアブラナに接種しても抵抗性の打破は観察されていない（Jenner et al. 2002）。

2. ウイルスに対する植物の防御反応

(1) 過敏感反応（hypersensitive reaction, HR）

植物が病原体の侵入を受けると、大きく分類して二つの経路により抵抗性反応が引き起こされる。一つは、細菌の鞭毛タンパク質フラジェリンに代表されるような、病原体が持つ共通構造体（ペプチド、タンパク質、脂質、多糖類等）である microbial-, pathogen-associated molecular patterns（MAMPS, PAMPS）を認識することで誘導される PAMP-triggered immunity（PTI）がある。細胞膜上に宿主が持つ pattern recognition receptor（PRRs）によって認識する。これが病原体の侵入に対する植物の最初の防御反応と言える。一方、PTI をかいくぐり細胞内に侵入した病原細菌は、宿主の細胞内で増殖しやすい環境を整えるためにエフェクターと呼ばれるタンパク質を分泌する。二つ目の防御機構はこれを認識することで誘導される effector-triggered immunity（ETI）である。宿主はこのエフェクターを nucleotide binding site（NB）及び leucine rich repeat（LRR）ドメインを持つタンパク質により認識する。このタンパク質をコードする遺伝子を抵抗性遺伝子と呼ぶ（Jones and Dangl 2006）。エフェクターは遺伝子対遺伝子説（gene-for-gene theory）では非病原性遺伝子として説明される。ETI が誘導されると、宿主細胞は侵入部位において、多糖類やフェノール類の蓄積による形態学的変化、活性酸素の発生、ファイトアレキシンや PR タンパクの生成など生化学的な変化を急激に引き起こす。これらの反応を HR といい、それによって引き起こされる細胞死を過敏感細胞死という。タバコモザイクウイルス（*Tobacco mosaic virus*, TMV）とタバコ（*Nicotiana tabacum*）の例

では、TuMV の複製酵素の一部 p50 が *N* 遺伝子にコードされる TIR（toll-like receptor）-NB-LRR タンパク質によって認識され HR が誘導される（Padgett and Beachy 1993; Whitham et al. 1994）。また、CMV と *A. thaliana* の組合せでは、CMV の CP が、*RCY1* にコードされる CC（coiled-coil）-NBS-LRR タンパク質によって認識され HR が誘導される例が報告されている（Takahashi et al. 2001）。

(2) 高度抵抗性（extreme resistance, ER）

ER において、侵入したウイルスはほとんど検出されず、また、顕微鏡レベルでも細胞死は観察されない。*Soybean mosaic virus* の HC-Pro 及び P3 とダイズの *Rsv1* の組合せや（Wen et al. 2013）、*Potato virus X*（PVX）の CP とジャガイモの *Rx* の組合せ（Bendahmane et al. 1999）による ER などが報告されている。ER は HR と独立した経路により誘導されると考えられていたが、*Rx* の配列解析の結果 NB-LRR 型の抵抗性遺伝子構造を持つことが明らかとなり、さらに、PVX の CP を過剰発現させると *Rx* によって HR が誘導されることが示された。また、HR 細胞死に対して ER がエピスタティックな関係あることも示されている（Bendahmane et al. 1999）。

(3) 全身獲得抵抗性（systemic acquired resistance, SAR）

病原体の侵入により植物体で抵抗性反応が誘導されると、侵入を受けていない部位への攻撃に備えるため、植物体全体に防御反応が誘導される。この抵抗性を SAR と言い、SAR は broad-spectrum な誘導抵抗性である。PTI または ETI により病原体を認識すると、侵入部位においてサリチル酸（SA）が蓄積し、その後全身で SA が蓄積する。SA シグナリングが SAR 誘導に関与することが、SA シグナリング欠損変異体を用いた実験により明らかにされている（Pieterse et al. 2009）。

近年の報告により、SAR 誘導のメカニズムが徐々に明らかとなってきている。SA シ

グナリングにより細胞内の酸化還元状態が調節されて還元状態となると、NPR1（non expressor of pathogen-related genes 1）タンパク質のシステイン残基が還元され、モノマー化する。これが核に移移行し、転写因子である TGA1 及び TGA4 と相互作用して *PR*（*pathogenesis-related*）遺伝子の活性化が誘導される。このとき NPR1 は DNA-binding 活性の cofactor として働き、この複合体が SAR 調節遺伝子発現を活性化するということが報告されている（Fobert and Després 2005）。

(4) 局部獲得抵抗性（local acquired resistance, LAR）

SAR は病原体の侵入を受けた植物体全体で誘導される抵抗性反応であるのに対し、LAR は病原体の侵入を受けた細胞周辺で誘導される抵抗性反応を言う。例として、TMV を接種したタバコ接種葉で観察される、SA の蓄積増加や、PR 1 及び PR 2 の発現増加などがある（Lazzarato et al. 2009）。

(5) 抵抗性誘導シグナル物質

① 活性酸素種（reactive oxygen species, ROS）

ROS は病原体に対する抵抗性反応において、細胞死に関与する物質として知られ、スーパーオキシドアニオンラジカル、ヒドロキシルラジカル、過酸化水素及び一重項酸素が含まれる。病原体に対する抵抗性において、抵抗性誘導シグナル物質として重要なサリチル酸及びエチレンの誘導や、PR タンパク質及び抗菌性物質であるファイトアレキシンの誘導に関与している。中でも過酸化水素は ROS の主要物質であり、膜透過性を持つことから植物体全体への抵抗性シグナル物質として機能している。また、oxidative burst と呼ばれる感染部位での一過性の過酸化水素の蓄積増加は HR の誘導に関与している。さらに、その後に全身の非感染部位で生じる microburst と呼ばれる過酸化水素の蓄積は SAR の誘導に関与すると考えられている（Alvarez et al. 1998）。病原体

の感染だけでなく、傷害によっても植物体全体で過酸化水素の蓄積が増加することが知られており、ROS は植物の防御機構に深く関与していると言える（Sandermann 2000）。

② サリチル酸（salicylic acid, SA）

SA は病原体への抵抗性反応において重要な役割を果たす植物ホルモンとして知られている。HR など、病原体侵入後の早期の反応においてその誘導シグナルとして機能しているとされており、ほかにも前述した SAR への関与も知られている。抵抗性誘導のマーカー遺伝子である *PR 1, 2* 及び *5* は SA を介して誘導される（Derksen et al. 2013）。Biotrophic な病原体に対する HR, SAR などの抵抗性反応には SA がシグナルとして関与し、necrotrophic な病原体及び土壌中の共生微生物による感染に対して誘導される防御反応である induced systemic resistance（ISR）にはジャスモン酸やエチレンがシグナルとして機能し、病原体によってシグナル経路が使い分けられていることが明らかとなってきている（Pieterse et al. 2009）。

③ ジャスモン酸類縁体（jasmonates, JAs）

抵抗性シグナルとして誘導されたジャスモン酸（JA）は JA コンジュゲート合成酵素 JAR1 によって、すばやくジャスモン酸イソロイシン（JA-Ile）に変換される。これが生体内での活性体であるとされている（Van der Does et al. 2013）。JA-Ile は F-box タンパク質である COI1（coronatine insensitive 1）と相互作用し、JAZ（Jasmonate Zim-domain）タンパク質をユビキチン化の後、タンパク質分解酵素により JAZ タンパク質を分解する。JAZ タンパク質は JAs 誘導遺伝子の転写因子に結合してその発現を抑制しているため、JAZ タンパク質の分解によってこれらの遺伝子の誘導が活性化される。抵抗性に関わる JAs 誘導遺伝子として *PDF1.2*（*plant diffensin 1.2*）や *PR 3,4* が挙げられる（Derksen et al. 2013）。

④ エチレン（ethylene）

エチレンは necrotrophic な病原体及び土壌中の共生微生物による感染に対する ISR において、一般的にジャスモン酸類縁体とともにシグナルとして働いている（Pieterse et al. 2009）。エチレンはまず小胞体で ETR1/2、ERS1/2 及び EIN4 などのレセプタータンパク質により認識され、このレセプタータンパク質は CTR1（constitutive triple response）と結合する。これはさらに EIN2 と結合し、核に局在するようになる。核において EIN3 及び EIN3 様転写因子の分解を抑制することで、これらの転写因子を活性化させ、さらに ERF（ethylene response factor）転写因子を活性化させる。活性化された ERF は 11 塩基の保存配列（TAAGAGCCGCC）から成る GCC box を認識して転写を行う。PR 遺伝子など抵抗性に関わる遺伝子がこの GCC box をコードしており、このようにしてエチレンによる抵抗性誘導シグナル経路が機能している（Broekaert et al. 2006）。

⑤ アブシジン酸（Abscisic acid, ABA）

ABA は乾燥など非生物的ストレスに反応して蓄積されるシグナル物質として、また、種子休眠、発芽、実生の生長及び根の伸長など形態学的な変化を誘導する植物ホルモンとして知られている。このほかにも生物的ストレスに対するシグナル物質であることが明らかとなっており、報告は少ないものの、他の植物ホルモンとの相互作用や防御反応におけるシグナルとして機能しているという報告がある。アラビドプシスの *Plectrosphaeria cucumerina* 及び *Alternaria brassicicola* に対する抵抗性において重要なシグナルとして機能することや、抵抗性反応において JAs と相乗効果を示すことが報告されている（Derksen et al. 2013）。

(6) ウイルスに対する RNA サイレンシング

RNA サイレンシングは植物のウイルスに対する防御反応において重要な役割を果た

している。ウイルスが植物に感染して複製する際、ウイルス自身がコードする複製酵素により複製中間体としてウイルスの dsRNA が生成される。宿主の持つ RNA 依存性 RNA 複製酵素（RDR）の 1 つである RDR6 によっても dsRNA が増幅される。これらの dsRNA は dsRNA 特異的分解酵素である Dicer によって 21～24 ヌクレオチド（nt）の siRNA に切断される。*A. thaliana* では DCL1～DCL4 の 4 種類の Dicer が確認されているが、このうち DCL2 と DCL4 が重要でそれぞれ 22nt、21nt の siRNA を生成する（Ding 2010）。siRNA は RISC と呼ばれるタンパク質複合体に取り込まれ、そこで 1 本鎖 RNA にほどかれ、片方の RNA を放出する。RISC は保持する siRNA 鎖に相補的な RNA 配列を認識し、RISC の一部であるスライサータンパク質 AGO によってその相補的な RNA 配列、つまりウイルス RNA を切断する。ウイルス RNA の切断には AGO1 が主要な役割を果たしているが、AGO2 や AGO7 が関与することも報告されている（Qu et al. 2008; Takeda et al. 2008）。さらに、切断されて短くなった RNA は、RDR6 によって dsRNA に再度変換されて二次的な siRNA 生成が行われる（Wang et al. 2011a）。

3. アスコルビン酸（Ascorbic acid, AsA）

(1) AsA の機能

AsA はビタミン C の名前で一般的によく知られている物質であり、細胞内で水溶性の抗酸化物質として機能している。植物細胞内に比較的豊富に蓄積されている物質である（Zechmann 2011）。植物細胞における機能は多様であり、主要な抗酸化物質として働くほか、酵素の cofactor、細胞の生長・伸展の制御及びシグナル伝達物質などとして働いている（Gallie 2013a）。また、プログラム細胞死、病原体に対する応答、植物ホルモンに対する応答、開花や老化、環境ストレスへの応答などにも関与することが報告されている（Linster and Clarke 2008）。

(2) AsA 代謝経路

① AsA 合成

哺乳類においては、AsA は D-glucose を起点とした 1 つの経路で合成されるのに対し、植物の合成経路はこれと大きく異なっていることが近年明らかとなっている（Gallie 2013a）。植物における AsA 合成経路は少なくとも 4 つあることが報告されている。そのうちの一つであるマンノース／ガラクトース経路はよく研究されている経路である。この経路上で AsA 前駆体とされる L-galactose や L-galactono-1,4-lactone を外から投与すると AsA 蓄積量が増加することが明らかとなっている（Conklin et al. 1997; Wheeler et al. 1998）。また、この経路上の酵素 GDP-mannose-pyrophosphorylase（VTC1）、GDP-L-galactose phosphorylase（VTC2, VTC5）及び L-galactose-1-P phosphatase（VTC4）の各遺伝子欠損変異体では、野生型に比べてそれぞれ 10%、30%及び 40%まで AsA 蓄積量が低下することが明らかとなっている（Conklin et al. 2006; Pavet et al. 2005）。*vtc* 変異体の報告から、マンノース／ガラクトース経路による AsA 合成は主に葉組織での AsA の蓄積に寄与していることが示唆されており、AsA 合成能としてこの経路が重要な役割を果たしていると考えられる（Gallie 2013a）。次に、ペクチンを起点としたガラクツロン経路がある。この経路上の酵素 GalUR について、イチゴ由来の遺伝子を *A. thaliana* で過剰発現させたときに AsA 蓄積量が増加することが報告されている（Agius et al. 2003）。一方で、イチゴの実における GalUR による AsA 合成量は小さいということが示唆されており、この経路の総 AsA 蓄積量への寄与は小さいと考えられている（Loewus 1963）。これらのほかに、グロース経路、ミオイノシトール経路の存在が明らかになっているが、これらの合成経路については報告が少なく、より詳細な研究が必要である。

② AsA の酸化及びリサイクル

AsA はアスコルビン酸酸化酵素（Ascorbate oxidase, AO）やアスコルビン酸過酸化酵

素（Acorbate peroxidase, APX）により触媒されて酸化されると、モノデヒドロアスコルビン酸（MDHA）になる。これはさらに非酵素的な反応により DHA へと変換される。DHA はさらに 2,3-diketogulonic acid へ自然酸化され、分解される（Wang et al. 2010）。AsA が抗酸化物質として機能する際には、このように自身が酸化される反応が生じている。MDHA や DHA はそのまま分解されるのではなく、還元反応により AsA にリサイクルされる。MDHAR はモノデヒドロアスコルビン酸リダクターゼ（MDHAR）により、DHA はデヒドロアスコルビン酸リダクターゼ（DHAR）によって AsA にリサイクルされる。タバコの MDAHR を過剰発現させた *A. thaliana* においてわずかに AsA 蓄積量が増加したという報告があるが（Yin et al. 2010）、一方でトマト MDHAR を過剰発現させた場合に AsA 蓄積量が減少したという報告もあり（Haroldsen et al. 2011）、MDHAR については十分な研究がなされていないのが現状である（Gallie 2013b）。DHAR については多くの報告があり、*A. thaliana*、コメ、トマト、ゴマ、タバコ、バレイショ、トウモロコシなどの DHAR を過剰発現させることで AsA 蓄積量が増加することが明らかとなっている（Gallie 2013a, b; Wang et al. 2010）。DHAR の活性は細胞内の AsA プールサイズや酸化還元の調節に大きく寄与していると言える。

(3) ストレスに対する AsA の蓄積応答

*A. thaliana* において傷害によって AsA 蓄積量が増加することが報告されている（Suza et al. 2010）。このとき、傷害によって AsA 合成経路の酵素遺伝子の発現が上昇していることから、合成経路が活性化されたことで AsA 蓄積量が増加したことが強く示唆された。傷害を受けると、ジャスモン酸（JA）が蓄積することが知られていることから、ジャスモン酸メチル（MeJA）処理による AsA 蓄積量の変化も調べたところ、増加することが明らかとなった。よって、*A. thaliana* においては、傷害により JA 類縁体が蓄積し、これがシグナルとなって AsA 合成が促進され AsA 蓄積量が増加することが示唆されて

いる。ホウレンソウ（*Spinacia oleracea*）及びコマツナ（*B. campestris*）では、低温による AsA 蓄積量増加が報告されている（Tamura 1999）。これは、低温ストレスにより生じる活性酸素種を消去するためだと考えられている。

(4) AsA の抗ウイルス性

AsA の新たな機能として、抗ウイルス作用を持つことが明らかとなっている（Shimura et al. 2008）。植物はウイルスの侵入に対して RNA サイレンシングという防御機構によって、ウイルス RNA を切断・分解し、増殖を抑制している。これに対してウイルスは RNA サイレンシングサプレッサー（RSS）を産生し、RNA サイレンシング機構の重要な構成要素である siRNA、DCL 及び AGO などに結合することで RNA サイレンシング機構を阻害する。Shimura et al.（2008）は 5000 種類の化合物に対して、surface plasmon resonance（Biacore） assay によってウイルス RSS タンパク質と結合する物質のスクリーニングを行い、8 つの候補化合物を得た。さらにゲルシフトアッセイによる結合強度の確認及び、*Nicotiana benthamiana* プロトプラスト系による CMV の 2b 及び *Tomato bushy stunt virus*（TBSV）の P19 といった RSS の阻害効果を調べる実験を行った。その結果、RSS の機能を阻害し、抗ウイルス効果の高い化合物の一つとして AsA を見出した。AsA をはじめ、8 つの候補化合物は負に帯電しており、これが正に帯電しているウイルス RSS の RNA 結合ドメインと結合するものと考えられている。

## 第 3 章　*Brassica rapa* 作物の *Turnip mosaic virus* に対する抵抗性遺伝子座 *Rnt1* のえそ病徴への関与

### 背景及び目的

植物ウイルスは、農薬や栽培法などによる防除が困難であることから、ウイルス病の制御には抵抗性遺伝子の導入が最も有効な方法であり（Bruening 2006）、現在、種々のウイルスに対して抵抗性を誘導する多くの優性または劣性遺伝子が同定されている。しかし、単一の抵抗性遺伝子による抵抗性はウイルスの変異によって打破されることがあるため、抵抗性遺伝子を用いる際、どのようにしてこの抵抗性を維持するのかという点が問題となる（Lecoq et al. 2004）。一方、ウイルスに感染した植物において病徴を抑制する耐性遺伝子はウイルスに対する打破の危険性が少なく有用である（Uchibori et al. 2009; Zhu et al. 2003）。また、ウイルス感染による被害の程度は、えそやモザイクといった病徴により異なるので、病徴のタイプの遺伝的制御も必要である。

TuMV はポティウイルス属のウイルスであり、アブラナ科作物を含む広範な植物に感染する（Walsh et al. 2002）。*B. rapa* では、TuMV 感染による病徴のタイプやその程度は品種により様々であるが、全身えそは植物体が枯死するためその被害は最も大きい。また、ハクサイ（*B. rapa* subsp. *pekinensis*）では、えそを生じた組織は軟腐病菌（*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*）などその他の病原菌が感染しやすくなるため（Tamura 1984）、ウイルスによるえそ病徴は軽微であっても被害は大きくなる。一方、モザイクは葉の奇形、収量や品質の低下を招くが、その程度が軽微な場合は病徴は目立たず経済的な被害は小さい。したがって、*B.rapa* において TuMV による被害を軽減するためには、えそ病徴を抑制するなど、病徴の制御が効果的であると考えられる。しかし、アブラナ科作物における TuMV による病徴誘導のメカニズムや病徴発現を制御する遺伝子に関する

研究は少ないのが現状である。アブラナ（*B. napus*）では、TuMV-UK1 に対する抵抗性遺伝子 *TuRB01* と密接に連鎖する全身えそを誘導する遺伝子の報告がある（Jenner et al. 2000）。一方、TuMV の P3 タンパク質は非病原性因子であるほかに、*B. napus* や *B. juncea* に対する病徴の程度を決定する因子でもあることが明らかとなっている（Jenner et al. 2003）。また、*A. thaliana* では、TuMV の P3 と宿主の *TuNI* 遺伝子との相互作用によりえそが誘導され、このえそは HR 様の細胞死であることが報告されている（Kaneko et al. 2004; Kim et al. 2008; Kim et al. 2010）。

第 3 章では、*B. rapa* における TuMV による病徴誘導のメカニズムを明らかにすることを目的として、TuMV に対する抵抗性遺伝子とえそ病徴誘導遺伝子を同定し、それらの関係について解析した。また、TuMV 側のえそ病徴誘導因子の同定も行った。

## 材料と方法

1. 材料

(1) 供試ウイルス

*Turnip mosaic virus*（TuMV）のダイコン系統（TuR1)、キャベツ系統（TuC)、アブラナ系統（UK1）を用いた。また、UK1 の変異体として得られた UK1 mutant （UK1m)、site-directed mutagenesis により UK1 感染性クローンを基にアミノ酸変異を伴う塩基置換を導入した感染性クローン UK1-P3m、UK1-CIm 及び UK1-CPm を用いた。接種源は各感染性クローンを *Nicotiana benthamiana* に接種後、これをカブ品種「雪姫かぶ」で継代したものを用いた。「雪姫かぶ」はグロースチャンバー（温度 21℃、12 時間日長）で育成した。

(2) 供試植物

ハクサイ品種「秋まさり」「優春」「はやひかり」「山東白菜」「Tropical Delight」及びカブ品種「早生大蕪」並びにそれらの自殖・交雑後代を用いた。

2. 方法

(1) 植物個体の養成

植物は MLR-350 グロースチャンバー（SANYO）で 21°C、12 時間日長、150 μmol/m/s で育成した。

(2) ウイルスの接種

播種後約 1 週間の展開した子葉に汁液接種を行った。接種する葉には接種前にカーボランダムを適当量振りかけた。乳鉢に接種源 0.1 g あたり 1ml となるように 0.1 M リン

酸緩衝液を入れ、さらにリン酸緩衝液 1 ml あたり 2.3 mg の DIECA を加えて溶解させた。ここへ接種源を入れて乳鉢でよくすりつぶした。綿棒に汁液を含ませ、葉の表側を丁寧に擦った。接種後すぐに水をかけてカーボランダムや余分な汁液を洗い流した。

(3) 植物組織からの Total RNA 抽出

乳鉢に 0.1 g の葉組織に対し、1 ml の TRIzol（Invitrogen）を入れ、乳棒でよく磨際した。磨砕液を 4°C、12,000 G で 10 分間遠心し、上清を回収した。これに 200 µl のクロロフォルムを加えて、15 秒ボルテックスをかけて室温で 3 分放置した。4°C、12,000 G で 15 分間遠心し、上清を回収した。回収した上清の半量のイソプロパノールと半量の沈殿バッファー（0.8 M Sodium citrate, 1.2 M NaCl）を加え、室温で 10 分放置した。4°C、12,000 G で 10 分間遠心した。上清を捨て、ペレットを 80%エタノールでリンスした。エタノールを除き、ペレットを風乾し、40 µl の $H_2O$ にペレットを溶解した。

(4) 逆転写反応及び PCR による cDNA の合成並びにクローニング

逆転写反応は AMV Reverse Transcriptase XL（Takara）のキットを用い、添付のプロトコールに従って行った。逆転写産物は 10×Buffer for KOD-Plus-ver.2（東洋紡）5 µl, 2 mM dNTP 5 µl, 25 mM $MgSO_4$ 3 µl, Forward Primer（10 µM）1.5 µl, Reverse Primer（10 µM）0.75 µl, KOD-Plus-ver.2 1 µl, 逆転写反応産物 3 µl, $H_2O_2$ 30.75 µl を 94°C 2 分の後、98°C 10 秒、Tm 値-5°C 30 秒、68°C 1 分/1 kb を 30 サイクルで増幅した。プライマー配列は Table 1 に示す。合成した cDNA は pCR-XL-TOPO ベクター（Invitrogen）または pGEM-T ベクター（Promega）にクローニングした。

(5) 大腸菌への形質転換、プラスミドの抽出

① コンピテントセルの調整

-80°C で凍結しておいた大腸菌（JM109 株）を LB プレート（Bacto-Trypton 2 g, Bacto-yeast extract 1 g, NaCl 2 g, Agar 3 g, up to 200 ml）にストリークし、37°C で 14~16 時間培養した。シングルコロニーの大腸菌を 1 M $MgCl_2$（フィルターろ過滅菌）及び 1 M $MgSO_4$（フィルターろ過滅菌）を 30 µl ずつ加えた SOB 液体培地（Bacto-Trypton 10 g, Bacto-yeast extract 2.5 g, 1M NaCl 5 ml, 1M KCl 1.25 ml, up to 500 ml）3 ml に入れ、37°C で 14~16 時間振とう培養した。SOB 液体培地 200 ml、1 M $MgCl_2$ 及び 1 M $MgSO_4$ を 20 µl ずつ加え、そこに振とう培養した培養液 2 ml 入れて 550 nm で吸光度が 0.4~0.8 になるまで約 2 時間振とう培養した。氷上に 10 分間静置し、氷冷したナルゲンチューブに移し、4°C、3,500 rpm で 10 分間遠心し上清を捨てた。これに TFB（35 mM 酢酸カリウム, 50 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 45 mM $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 100 mM 塩化ルビジウム, 15% ショ糖, 酢酸で pH 5.8 に調製, up to 100 ml）を 4 ml 加え、静かにペレットを懸濁した。4°C、3,500 rpm で 10 分間遠心し、上清を捨てた。TFB を 1 ml 加え、静かに懸濁した。DMSO を 70 µl ずつ加え、100 µl ずつ分注し、-80°C で保存した。

② 大腸菌の形質転換

コンピテントセルを氷上で溶かし、クローニングした反応液 10 µl を加え、氷上で 30 分静置した。42°C、45 秒インキュベートし、その後急冷した。2YT 液体培地（Bacto-tryptone 3.2 g, Bacto-yeast extract 2 g, NaCl 2 g, up to 200 ml）を 900 µl 加えて総量を 1 ml とし、37°C で振とう培養した。これを LB-amp プレート（アンピシリン終濃度 50 µl/ml）にストリークした。ただし、ブルーホワイトセレクションを行なう場合はプレートに 50 µl の 2% X-gal 溶液（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D ガラクトピラノシドを N,N-ジメチルホルムアミドで 2%に溶解）と 100 mM IPTG（イソプロピル-β -D(-)チオガラクトピラノシド）溶液をストリークした後に大腸菌をストリークした。プレートを 37°C で一晩培養した。

③ プラスミド抽出

LB 液体培地（Bacto-Trypton 2 g, Bacto-yeast extract 1 g, NaCl 2 g, up to 200 ml）を 5 ml ずつ分注し、カナマイシンを 50 mg/ml となるように加えた。滅菌した爪楊枝で単コロニーをつつき、爪楊枝ごと試験管に入れた。これらの作業はクリーンベンチ内で行なった。37°C の恒温振とう機で一晩培養した。一晩培養した培養液を室温、5,000 rpm で 1 分間遠心し、集菌して培養液を除いた。200 µl の冷蔵しておいた Solution 1（50 mM グルコース, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8.0）で懸濁した。チューブに Solution 2（0.2 M NaOH, 1% SDS）を 300 µl 加え転倒混和した。チューブを氷中に 5 分間置いた。チューブに冷蔵しておいた Solution 3（3.0 M 酢酸カリウム）を 300 µl 加え転倒混和した。チューブを氷中に 5 分間置いた。室温、10,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を新しいチューブに移した。RNase A（DNase-free）を最終濃度 20 µl/ml になるように加えた。37°C で 1 時間インキュベートした。クロロホルムを 400 µl 加え、30 秒間転倒混和した。室温、5,000 rpm で 1 分間遠心し、上層を新しいチューブに移した。移した上層と等量のイソプロパノールを加え、転倒混和した。室温、13,000 rpm で 10 分間遠心し、イソプロパノールを除いた。70%エタノールを 500 µl 加えてペレットやチューブの内壁を洗い、室温、13,000 rpm で 1 分間遠心した。エタノールを除き、約 5 分間ペレットを風乾させた。32 µl の滅菌水を加え、DNA を溶解した。氷中で冷却した 4 M NaCl 8 µl 及び 13% PEG8000 40 µl を加えてよく混ぜ、氷中に 20 分間置いた。4°C、13,000 rpm で 15 分間遠心した。上清を除き、70%エタノール 500 µl でペレットを洗った。エタノールを除き、ペレットを風乾させた。滅菌水 20 µl を加えてプラスミド DNA を溶解した。

(6) DNA 配列解析

DNA 配列解析は、ABI PRIZM 310 Genetic Analyzer を用い、添付のプロトコールに従って行った。プライマー配列は Table 1 に示す。

(7) 塩基置換導入感染性クローンの作成

塩基置換を導入した感染性クローン（UK1-P3m、UK1-CIm 及び UK1-CPm）は QuickChange SiteDirected Mutagenesis Kit（Strategene）により、UK1 感染性クローンに変異を導入して作成した。

(8) 植物組織からの Total DNA 抽出（CTAB 法）

新鮮な葉を抽出用バッファー（50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM NaCl, 2% CTAB, 1% Polyvinylpyrrolidone-40）700 µl で磨砕した。磨砕液を 60°C、30 分間インキュベートした。この際、5~10 分おきに取り出して軽く混合した。室温で 2 分間放冷したあと、クロロホルム/イソアミルアルコール（24:1）を 700µl 加え、30 秒ほど転倒混和した。室温で 5 分間、5,000 rpm で遠心した。上層を移し、等量のイソプロパノールを加えて転倒混和した。室温で 5 分間、14,000 rpm で遠心し、上澄みを取り除いた。70%エタノールを 500 µl 加え、DNA のペレットを洗浄した。室温で 3 分間、14,000 rpm で遠心した。上澄みを取り除き、DNA ペレットを風乾させた。50 µl の TE バッファー（10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0）を加えて DNA を溶解させた。

(9) DNA 多型マーカー

BRMS SSR マーカー配列は野菜茶業研究所が公開している VegMarks データベース（http://vegmarks.nivot.affrc.go.jp/VegMarks/jsp/index.jsp）から得た。indel PCR マーカーは *Brassica* データベース（BRAD; http://brassicadb.org/brad/）で公開されているハクサイゲノム配列 Scffold000009 及び Scaffold000129 をもとに作成した。作成したプライマー配列は Table 2 に示す。

**Table 1** Primer's sequences used for amplification and sequencing of TuMV-UK1m

| Primer name | | | Primer's sequence (5'→3') |
|---|---|---|---|
| P1,HC-F | Amplification | Forward | CACAAATCTTTCAAAGCATTCAAGC |
| P1,HC-R | | Reverse | GGATCCATGAGTGTCCTCCCATTC |
| P3,CI-F | Amplification | Forward | CTGTGGAACAACTCATCAAATTCACGAG |
| P3,CI-R | | Reverse | TCCAAGAACTCCACAAAGTACCAGCAC |
| 6K2,NIa-F | Amplification | Forward | GAATGCTGATCACTCATTTGCTAC |
| 6K2,NIa-R | | Reverse | GCTCGAACAGCCACCGATTCTGC |
| NIb,CP-F | Amplification | Forward | GAATATACAAGCATCGCAACCG |
| NIb,CP-R | | Reverse | CTTATAGTCTACCAGCATACAAC |
| P1, HC-F1 | Sequencing | | CGTTATCAAAGCAATCACC |
| P1, HC-F2 | Sequencing | | CGTGTTGAGGATGCACGAGG |
| P1, HC-F3 | Sequencing | | CATGTTGACACGATCCCTGG |
| P1, HC-F4 | Sequencing | | CAAGTTGTACGATGCCAGG |
| P1, HC-F5 | Sequencing | | CAATCACTGAGCAGTGCAAAC |
| P1, HC-F6 | Sequencing | | GGTGAGAGAGGATACCATGC |
| P1, HC-F7 | Sequencing | | CGAGGAGAATAAAATGTAC |
| P1, HC-R1 | Sequencing | | CTGTGTACAGTTTAGGTTGC |
| P3-F1 | Sequencing | | TAGTCAGAGTGTGTTAGCCC |
| P3-F2 | Sequencing | | AAGCGAAGCCGATTTAGGCG |
| CI-F1 | Sequencing | | AGGACAGAAGGGAAGTTCAT |
| CI-F2 | Sequencing | | AATCTCAGTGATGACCAGTGG |
| CI-F3 | Sequencing | | CAAGCTACAATGAGGTAGACG |
| CI-F4 | Sequencing | | AGGTCACGCTCTGCGAATAG |
| CI-F5 | Sequencing | | ATTAGCCATACCTCACCGAG |
| CI-F6 | Sequencing | | CGAACTTCTCACTGCAGAGCA |
| 6K2, NIa-F1 | Sequencing | | GAGTATGGAGCTCTTGAGGC |
| 6K2, NIa-F2 | Sequencing | | GATCCTGAAGATTTCTCTGC |
| 6K2, NIa-F3 | Sequencing | | GTAACTCCATGTTCAGAGGG |
| 6K2, NIa-F4 | Sequencing | | CAATAATGCCAGTGGAGAAC |
| NIb, CP-F1 | Sequencing | | GCTAATCTCAGACCTCGAC |
| NIb, CP-F2 | Sequencing | | GATGAGAATGACATATTCG |
| NIb, CP-F3 | Sequencing | | GTATTGCGATGCTGATGGCTC |
| NIb, CP-F4 | Sequencing | | GAGCCAGAGCGAATAGTATC |
| NIb, CP-F5 | Sequencing | | GGTGAAACGCTTGATGCAGG |
| NIb, CP-F6 | Sequencing | | CTCAATGGTTTAATGGTCTGG |
| NIb, CP-F7 | Sequencing | | GTACAACGGTAGAGAACACG |

**Table 2** Primer's sequences for amplification of indel PCR markers

| Indel PCR marker | | Primer's sequence (5'→3') |
|---|---|---|
| 9-2.4M | Forward | ATCCACCGGAGATAGTTGCGAAAGC |
| | Reverse | AGGTCTCCGTTTAAAGTTAGCCTCC |
| 129-center | Forward | AACAAGTGCATCTGTGTTCACCAGCAAG |
| | Reverse | GATTCGTAGGTACTTTACTCAGTGGTC |
| 129-0.3M | Forward | ATGGCACTTGTCCTCGCAAACTGTAC |
| | Reverse | GCGCGTTTAAGCTCAAGGAGAATGAG |

## 結果

### TuMV-UK1 に対する *B. rapa* の病徴誘導因子

TuMV に感染した *B. rapa* において、病徴のタイプがどのように決定されるのか明らかにするため、TuMV-UK1 系統及びこれに関与する突然変異系統 UK1m をハクサイ 3 品種、カブ 1 品種に接種した。ハクサイ品種「優春」は TuMV-UK1 感染により全身えそを生じた。また、マイルドなモザイクがえそとともに生じる場合もあった。ハクサイ品種「はやひかり」におけるえそ病徴は「優春」で観察されるものよりもマイルドであった。「はやひかり」では、より小さく、少数のえそ病斑が生じ、感染葉は徐々に退緑した（Figure1）。「はやひかり」の葉脈に沿ったえそは、葉のカールを引き起こした。また、「はやひかり」のマイルドなモザイクを生じた感染葉では奇形も観察された。カブ品種「早生大蕪」は UK1 に対してモザイクを示した（Figure 1）。一方、ハクサイ品種「秋まさり」と「秋まさり」由来の実験系統 AS9 は UK1 に対して抵抗性を示した（Figure 1）。UK1 を「秋まさり」や AS9 の子葉に接種すると、ほとんどの場合病徴は見られず、まれにわずかなえそ斑点が観察された。よって、UK1 に対する「秋まさり」の抵抗性は高度抵抗性であると考えられた。この抵抗性は UK1 の変異により打破され、感染した個体は全身えそを示した（Figure 1）。この UK1 変異体（UK1m）に対する他の 3 品種の病徴は、マイルドなモザイクに変化した。これらの結果から、TuMV の感染により現れる病徴のタイプは、品種とウイルス系統の組合せにより決定されると考えられた。

病徴誘導に関する宿主側の因子を同定するために、「優春」「はやひかり」及び「秋まさり」から自殖第 1（$S_1$）集団を得て、UK1 に対する反応を調べた。「優春」から得られた全ての $S_1$ 植物は全身えそを示したが、「はやひかり」及び「秋まさり」から得られた $S_1$ 集団の UK1 への反応は「はやひかり」や「秋まさり」と異なっていた（Table 3）。「はやひかり」$S_1$ 集団ではモザイク 34 個体、えそ 11 個体に分離した。この $S_1$ 植物に

おけるえその程度は「はやひかり」が示すものよりも激しく、「優春」と同程度であった。$S_1$集団において、「はやひかり」と同程度のマイルドなえそはほとんど観察されなかった。これらの結果から、「はやひかり」におけるえそは単一の劣性遺伝子により制御されており、この遺伝子をヘテロ型で持つ「はやひかり」ではえその発現が環境要因や遺伝的背景により大きく影響を受けていることが示唆された。一方、葉の奇形は$S_1$集団のうちモザイクを示した 34 個体中 20 個体で観察された。このことから、「はやひかり」の葉脈のえそに伴う葉の奇形は他の因子によるものであると考えられた。「秋まさり」の$S_1$集団は抵抗性 29 個体、モザイク 9 個体に分離したことから、「秋まさり」は UK1 に対して優性の抵抗性遺伝子を持つことが明らかとなった（Table 3）。なお、AS9 は「秋まさり」$S_2$集団の中から、この抵抗性遺伝子をホモで持つ系統として選抜した系統である。抵抗性と全身えそを誘導する遺伝子間の対立性を調べるため、「秋まさり」と「優春」を交雑し$F_1$及び$F_2$集団を得た。$F_1$集団では抵抗性 46 個体と感受性 50 個体に分離し、理論比 1:1 に適合した（Table 3）。$F_2$世代 12 集団のうち、$F_1$で抵抗性を示した個体に由来する 6 集団では各集団内で“抵抗性”と“えそ”に分離し、$F_1$で感受性を示した個体に由来する 6 集団は各集団内で“えそ”と“モザイクまたはマイルドなえそ”に分離した。これらの分離比はそれぞれ 3:1 と 1:3 となった（Table 3）。これらの結果より、抵抗性遺伝子とえそ誘導遺伝子は同座またはごく近傍で連鎖していること、抵抗性遺伝子はえそ誘導遺伝子に対して優性、または上位下位の関係にあることが示唆された。一般的に、上述のような古典的な遺伝解析では劣性遺伝子同士以外遺伝子間の同座性を証明することは困難である。この問題に対して、同座であると証明されるまで異なる遺伝子座の遺伝子として扱うか、同座でないと証明されるまで複対立遺伝子として扱うか 2 通りの方法がある。病害抵抗性に対する遺伝子記号が極端に増えるのを避けるために、イネいもち病で行われているように（Inukai et al. 1994）ここでは後者を用いることとした。ここでは便宜的に、「秋まさり」の抵抗性遺伝子と「優春」のえそ誘導遺伝子を *Rnt1*

（Resistance and necrosis to TuMV）遺伝子座の複対立遺伝子としてそれぞれ *Rnt1-1* 及び *rnt1-2* とした。「秋まさり」由来で、えそ病徴を誘導しない劣性の複対立遺伝子は *rnt1-3* とした。*rnt1-2* は *rnt1-3* に対して不完全劣性であり、その結果 *rnt1-2*/*rnt1-3* は葉脈に沿ったマイルドなえそを伴う葉の奇形となる。

*Rnt1* 遺伝子座の染色体上の位置を決定するために、まず VegMarks データベースをもとに作成した SSR マーカーと、*Rnt1-1* を持つ AS9 及び UK1 に対して感受性であるハクサイ品種「山東白菜」から得た $S_1$ 集団である SS11 を交雑した $F_2$ 集団 46 個体用いて連鎖解析を行った。その結果、*Rnt1* は第 6 染色体上の SSR マーカーBRMS221 及び BRMS013 の間に位置することが明らかとなった。より詳細なマッピングのため、BRAD の情報をもとに BRMS221 及び BRMS013 を含む scaffold sequence から indel PCR マーカーを作成し、AS9 と SS11 の $F_2$ 集団 142 個体のうち感受性を示した 32 個体を用いて *Rnt1* とマーカーとの連鎖解析を行った。その結果、scaffold000129 内に作成した indel PCR マーカー 129-center と *Rnt1-1* は共分離したことから、これらは組換え価 0%でごく近傍に連鎖していることが明らかとなった（Figure 2）。

*Rnt1-1* と既に報告されている *TuRB01b*（Walsh and Jenner 2006; Walsh et al. 1999）はいずれも TuMV-UK1 系統を用いて同定されたこと、染色体 R6 上に座上していること、また、これら 2 つの抵抗性遺伝子に対する TuMV の非病原性遺伝子が CI であることから（Walsh et al. 2002）、*Rnt1-1* と *TuRB01b* が同一の遺伝子である可能性が考えられた。そこで *TuRB01b* を持つハクサイ品種「Tropical Delight」（Walsh et al. 2002）に UK1m や次節で作成した UK1-CIm を接種したところ、「Tropical Delight」の抵抗性は *Rnt1-1* 抵抗性に対して上位にあることが明らかとなった。すなわち AS9 は UK1m や UK1-CIm の感染により全身えそを示したが、「Tropical Delight」は抵抗性を示した（Figure 1）。接種葉に病斑は見られなかったことから、「Tropical Delight」の抵抗性も高度抵抗性であると考えられた。これらの結果により、*Rnt1-1* は *TuRB01b* とは異なる遺伝子であることが示唆

された。

**TuMV-UK1 の病徴誘導因子**

AS9 の UK1 に対する抵抗性はまれに打破され、えそを生じて全身感染に至った。「優春」、「はやひかり」及び「早生大蕪」にこの AS9 の TuMV 感染葉を接種源として接種すると、その病徴は UK1 のものから変化した（Figure 1）。この UK1 変異体（UK1m）は AS9 に全身えそを誘導するが、「優春」及び「早生大蕪」では病徴はよりマイルドなモザイクとなった（Figure 1）。また、「はやひかり」において、葉の奇形は UK1 接種時よりもより軽微なものとなった。これらの病徴変化に関与するウイルス遺伝子を同定するため、RT-PCR により UK1m ゲノム配列の増幅を行い（Figure 3）、クローン化し配列解析を行った。その結果、UK1m は 3518 番目（P3）、3636 番目（6K1）、5480 番目（CI）及び 9113 番目（CP）の位置に塩基置換が生じていることが明らかとなった（Figure 3）。6K1 における変異を除き、その他の変異はアミノ酸変化を伴う非同義置換となっており、P3 では Val から Ala（V1173A）、CI では Val から Glu（V1827E）、CP では Val から Ala（V3038A）となっていた。いずれの変異が病徴の変化や抵抗性の打破に関与しているのか明らかにするため、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た。各感染性クローン UK1-P3m, -CIm, -CPm をまず *Nicotiana benthamiana* に接種し、この感染葉を接種源として用いた。感染性試験の結果、CI における変異（V1827E）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（Figure 1, Table 4）。P3 の変異（V1173A）はいずれの品種や系統でも病徴に影響しなかったが、CP の変異（V3038A）は「早生大蕪」での病徴をわずかに軽減させた。これらの結果から、UK1 の CI における 1827 番目のアミノ酸が抵抗性と病徴（えそ、モザイク及び葉の奇形）に関与しているということが明らかとなった。Jenner et al.（2000）は、*B. napus* が持つ TuMV-UK1 抵抗性遺伝子 *TuRB01* による抵抗性を打破する TuMV の

アミノ酸変異箇所が CI 遺伝子における N1686D 及び H1857R であることを明らかにしている。しかし、これは本研究で明らかにした CI の変異箇所（V1827E）とは異なるものであった。

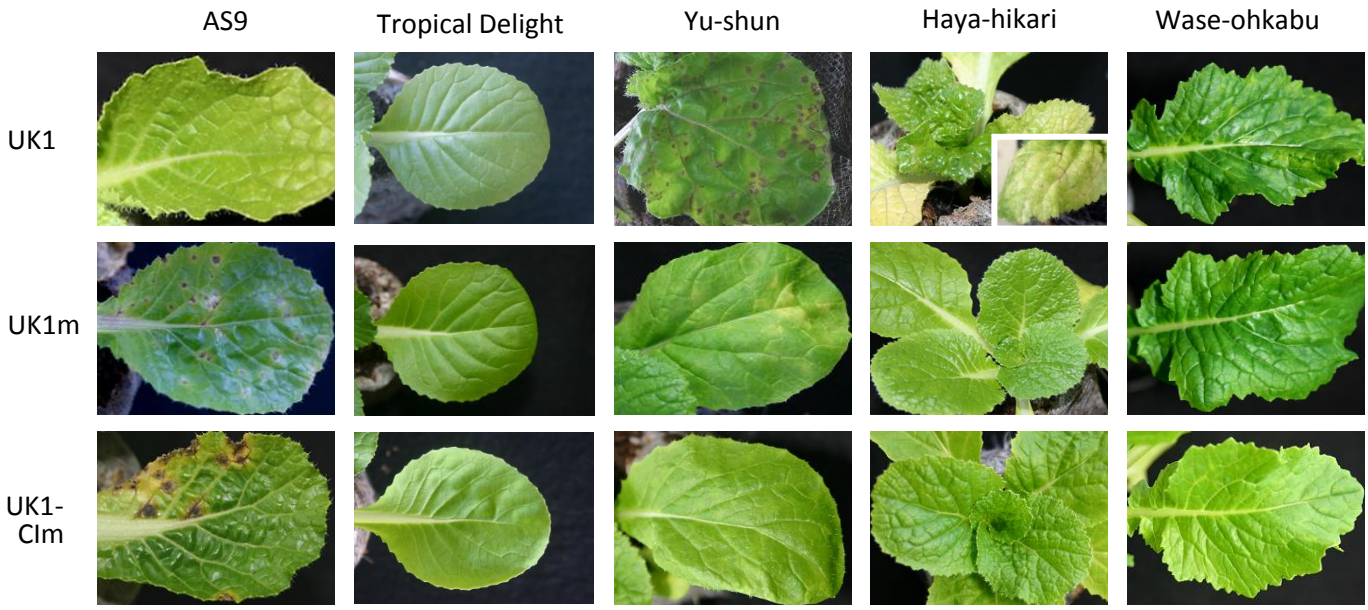



**Figure 1** Symptoms on *Brassica rapa* plants infected with various TuMV isolations.

Systemic symptoms on four cultivars of *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* and *B. rapa* subsp. *rapa* cv. Wase-ohkabu at 14 dpi with *Turnip mosaic virus* (TuMV) strain UK1, UK1m or UK1-CIm. UK1m was a spontaneous mutant of UK1. An amino acid substitution at position 1827 in CI detected in UK1m was introduced in UK1 to create UK1-CIm. Classification of symptom expression to TuMV in each cultivar is shown in Table 2. In Haya-hikairi systemically infected with UK1, small necrotic lesions and veinal necrosis were observed on the chlorotic leaf. Resistance was only performed in the combinations of AS9/UK1 and Tropical Delight/UK1, UK1m and UK1-CIm. In the rest of combinations of *B. rapa* cultivars and TuMV strains, all plants were systemically infected by TuMV. The systemic infection was confirmed by hammer blotting or ELISA.

**Table 3** Reaction of three Chinese cabbage cultivars and their selfed or crossed populations to *Turnip mosaic virus* (TuMV) strain UK1

| Cultivar or cross | Generation | Family[a] | Reaction to TuMV-UK1 | | | | Total | Expected ratio | $\chi^2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | R | NM | nM | M | | | |
| Yu-shun | | | 0 | 18 | 0 | 0 | 18 | | |
| Yu-shun | $S_1$ | | 0 | 83 | 0 | 0 | 83 | | |
| Haya-hikari | | | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 | | |
| Haya-hikari | $S_1$ | | 0 | 11 | 0 | 34 | 45 | 1:3 | $0.01^{ns}$ |
| Aki-masari | | | 18 | 0 | 0 | 0 | 18 | | |
| Aki-masari | $S_1$ | | 29 | 0 | 0 | 9 | 38 | 3:1 | $0.04^{ns}$ |
| Aki-masari /Yu-shun | $F_1$ | | 46 | 0 | 50 | 0 | 96 | 1:1 | $0.17^{ns}$ |
| Aki-masari | $F_2$ | R3 | 10 | 2 | 0 | 0 | 12 | 3:1 | $0.08^{ns}$ |
| /Yu-shun | | R5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 5 | 3:1 | $0.31^{ns}$ |
| | | R15 | 12 | 1 | 0 | 0 | 13 | 3:1 | $0.39^{ns}$ |
| | | R16 | 8 | 1 | 0 | 0 | 9 | 3:1 | $0.17^{ns}$ |
| | | R12 | 74 | 29 | 0 | 0 | 103 | 3:1 | $0.55^{ns}$ |
| | | R21 | 80 | 27 | 0 | 0 | 107 | 3:1 | $0.003^{ns}$ |
| | | S4 | 0 | 4 | 0 | 13 | 17 | 1:3 | $0.02^{ns}$ |
| | | S6 | 0 | 3 | 0 | 15 | 18 | 1:3 | $0.13^{ns}$ |
| | | S7 | 0 | 5 | 0 | 17 | 22 | 1:3 | $0.01^{ns}$ |
| | | S17 | 0 | 1 | 0 | 6 | 7 | 1:3 | $0.08^{ns}$ |
| | | S21 | 0 | 1 | 0 | 5 | 6 | 1:3 | $0.04^{ns}$ |
| | | S24 | 0 | 5 | 0 | 13 | 18 | 1:3 | $0.01^{ns}$ |

R: resistance, NM: necrosis with mosaic, nM: mild necrosis with mosaic, M: mosaic

ns: not significant

[a] $F_2$ families generated from $F_1$ plants of a cross between Aki-masari and Yu-shun

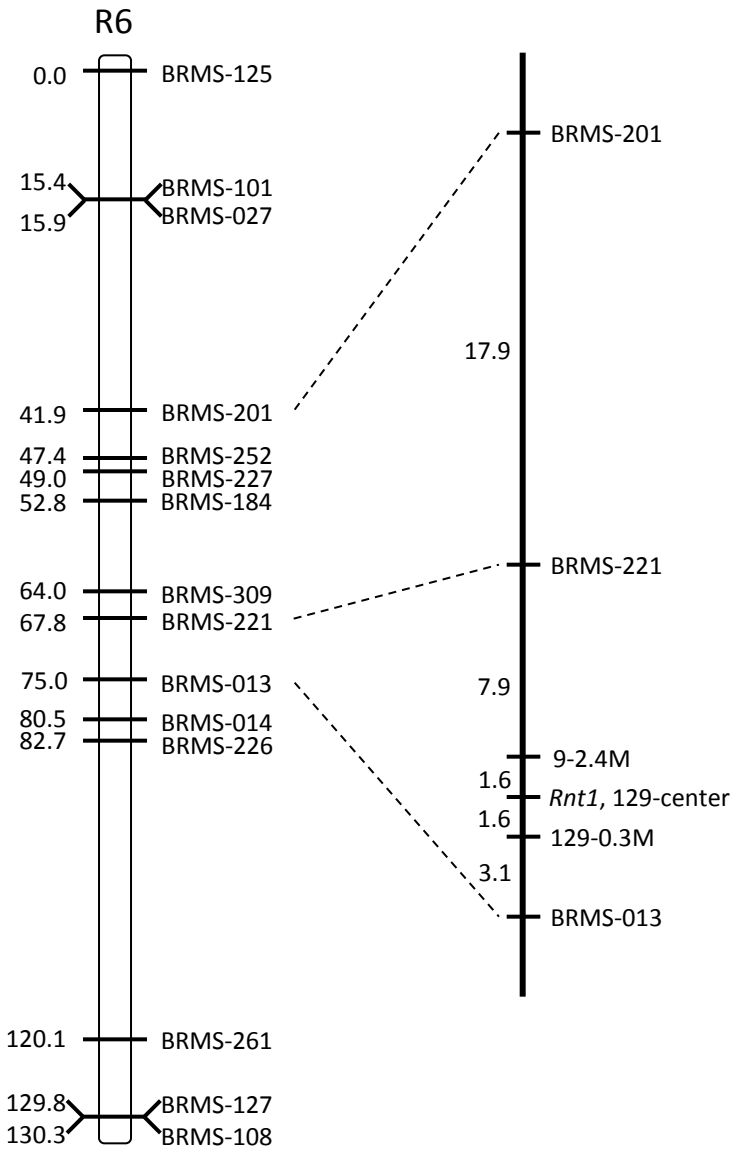



**Figure 2** Linkage relationships between the resistance gene *Rnt1-1* to TuMV-UK1 in Chinese cabbage (*B. rapa* subsp. *pekinensis*) cv. Aki-masari and the SSR markers on linkage group R6.

The left map was developed by the National Institute of Vegetable and Tea Science in Japan (http://vegmarks.nivot.affrc.go.jp/VegMarks/jsp/index.jsp). Names of SSR markers are to the right of the vertical lines and map distances are to the left.

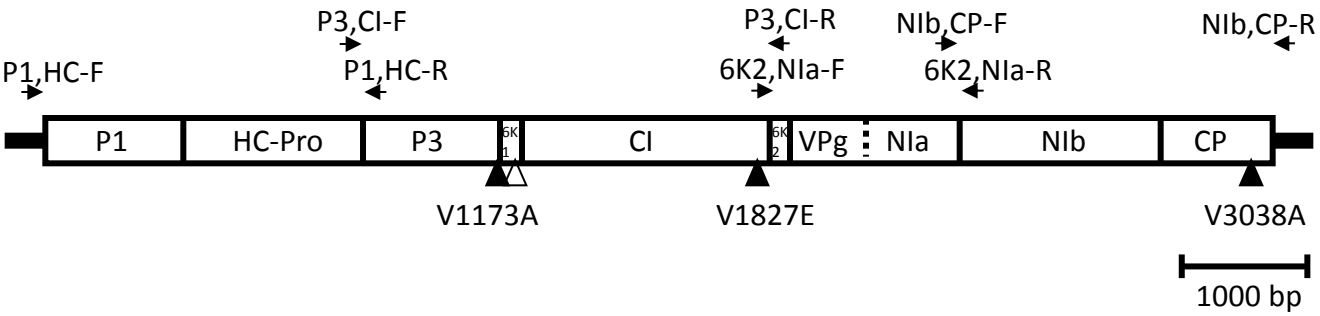



**Figure 3** Mutations detected on the genomic sequence in TuMV-UK1.

Black and white triangles indicate nonsynonymous and synonymous substitutions, respectively. Primers used for the RT-PCR are marked by arrows.

**Table 4** Type of systemic symptoms induced by the TuMV strain UK1, the mutant derived from UK1 (UK1m) and the UK1 infectious clones after the introduction of single amino acid substitutions in P3, CI and CP (UK1-P3m, -CIm and -CPm), respectively, in three cultivars of *B. rapa* subsp. *pekinensis* and *B. rapa* subsp. *rapa* cv. Wase-ohkabu.

| TuMV strain and mutant | Reaction or symptom type to TuMV | | | |
|---|---|---|---|---|
| | AS9 | Yu-shun [a] | Haya-hikari [a] | Wase-ohkabu [a] |
| UK1 | R | NM | nM | M+++ |
| UK1m | NM | M+ | M+ | M+ |
| UK1-P3m | R | NM | nM | M+++ |
| UK1-CIm | NM | M+ | M+ | M+ |
| UK1-CPm | R | NM | nM | M++ |

R: resistance, NM: necrosis with mosaic, nM: mild necrosis with mosaic, M: mosaic

[a] Number of plus signs indicates the severity of the mosaic

## 考察

本章において、*B. rapa* と TuMV の系における病徴のタイプは宿主の *Rnt1* 遺伝子座とウイルスの CI 遺伝子における遺伝子型の組合せにより決定されるということが明らかとなった。*B. rapa* において *Rnt1-1* は UK1 に対して抵抗性を誘導したが、*rnt1-2* は全身えそ、*rnt1-3* はモザイクを示す。さらに、*rnt1-2* と *rnt1-3* のヘテロ接合体では、葉脈に沿ったマイルドなえそを伴う葉の奇形を生じたが、この表現型は環境要因または遺伝的背景によって変化しやすかった。*Rnt1-1* と *rnt1-2* の同座性については、古典的な遺伝解析方法の限界により、明確に示すことはできなかった。しかしながら、UK1 の CI における単一のアミノ酸変化（V1827E）によって *Rnt1-1* による抵抗性が打破され、*rnt1-2* による全身えそが抑制されたことから、*Rnt1-1* 及び *rnt1-2* から生じる翻訳産物は直接または間接的に UK1 の CI の同一のドメインと相互作用していると考えられる。さらに、*Rnt1-1* は CI の V1827E 変異により全身えそを生じた。これらの結果から *rnt1-2* は *Rnt1* 遺伝子座の複対立遺伝子の一つであることが強く示唆された。「はやひかり」においてマイルドなモザイクを誘導する遺伝子と *rnt1-2* との対立性について本研究では明らかにしていない。しかし、「はやひかり」や「優春」において、UK1 感染で生じたえそが UK1-CIm 感染では誘導されなかったことから、「はやひかり」は *rnt1-2* を持つことが示唆された。

TuMV に感染した *B. rapa* において、*rnt1-2* は *rnt1-3* よりも被害の大きい全身えそを誘導することから、育種においては *rnt1-2* 遺伝子を取り除かなければならない。しかし、TuMV に全身感染した *B. rapa* は不稔になりやすく、ウイルスを感染させて *rnt1-3*/*rnt1-3* 遺伝子型を選抜し、その個体から採種することが困難である。このような特性を持つ場合は DNA 多型マーカーを用いるのが効果的である。本研究では、indel PCR マーカー 129-center が *Rnt1* のごく近傍で連鎖していることを明らかにした。このマーカーは選抜

マーカーとしてだけでなく、マップベースクローニングの際に *Rnt1* 遺伝子座の指標としても用いることができる。

TuMV 感染における *B. rapa* の全身えそ誘導機構については明らかにしていない。しかし、筆者が所属する研究室の研究グループは、TuMV を接種した *A. thaliana* において観察される全身えそが抵抗性反応である HR 細胞死と同様の現象であるということを報告している（Kim et al. 2008）。また、TMV に対して HR を誘導する *N. tabacum* の *N* 遺伝子は、コード領域やプロモーター領域の変異によって HR から全身えそに変化する（Dinesh-Kumar et al. 2000）。従って、抵抗性反応である HR と全身えそとの違いは、細胞死によってウイルスの増殖と移行を阻害できるかどうかにある。*Rnt1-1* による抵抗性が CI の変異によって打破され全身えそとなるのは HR が全身に誘導された結果であると捉えることができる。ER も HR も非病原性遺伝子及び抵抗性遺伝子の相互作用によって誘導されるが、ER はそれら 2 つの遺伝子産物のアフィニティが高い場合に誘導され、アフィニティが低い場合は HR を誘導すると考えられている（Bendahmane et al. 1999）。よって、V1827E 変異により CI 及び *Rnt1-1* 遺伝子産物との間の相互作用が弱まったため ER から HR に変化したと考えられる。また、全身えそを誘導する *rnt1-2* は V1827E 変異を持つ CI とは相互作用できないため、えそが誘導されないと考えられた。

本研究において、TuMV による病徴は宿主の抵抗性遺伝子座 *Rnt1* と TuMV の CI 遺伝子によって決定されるということを明らかにした。*Rnt1* 遺伝子座は TuMV に対する抵抗性だけでなく、えそや葉の奇形も制御しており（Table 5）、*Rnt1* 遺伝子座と非病原性遺伝子 CI との複雑な相互作用により異なる病徴をもたらしていた。さらに、CI タンパク質はおそらく他の宿主因子とも同じドメインにより相互作用しているものと考えられた。TuMV による異なる病徴発現について明らかにするためには、*Rnt1* 座の各対立遺伝子と CI についてのより詳細な研究が必要であるといえる。

**Table 5** Relationship between genotype and phenotype in the *Rnt1* gene of *B. rapa*

| Genotype | Phenotype | Cultivar or line |
|---|---|---|
| *Rnt1-1*/*Rnt1-1* | | AS9 |
| *Rnt1-1*/*rnt1-2* | extreme resistance | --- |
| *Rnt1-1*/*rnt1-3* | | Aki-masari |
| *rnt1-2*/*rnt1-2* | necrosis with mosaic | Yu-shun |
| *rnt1-2*/*rnt1-3* | mild necrosis with mosaic | Haya-hikari |
| *rnt1-3*/*rnt1-3* | mosaic | Wase-ohkabu |

## 第 4 章　*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

### 背景及び目的

AsA は植物の細胞内に比較的多量に蓄積されている抗酸化物質である（Zechmann 2011）。植物での生合成経路はマンノース／ガラクトース経路というメインの経路のほか、ミオイノシトール経路、グロース経路、ガラクツロン経路の合計 4 つの経路により合成される（Figure 4; Gallie 2013a; Suza et al. 2010）。また、酸化型 AsA であるモノデヒドロアスコルビン酸（MDHA）やデヒドロアスコルビン酸（DHA）を還元することで AsA をリサイクルする経路も存在している（Figure 4; Gallie 2013b）。この還元経路を担う酵素の 1 つデハイドロアスコルビン酸リダクターゼ（DHAR）を過剰発現させた *A. thaliana* や *N. tabacum* で AsA 蓄積量が 2〜4 倍に増加することが報告されており（Chen et al. 2003; Wang et al. 2010）、さらに筆者は DHAR 遺伝子のホモログの 1 つを欠損させた変異体で AsA 蓄積量が約 40%減少することを明らかにしている（unpublished）。このように、植物体内での AsA 蓄積には合成経路だけでなく、DHA や MDHA の還元によるリサイクル経路も重要な役割を果たしている。

AsA は植物体内でエチレン、アブシジン酸、ジベレリン及びアントシアニン生成の cofactor としても働いており、さらに、細胞分裂や細胞の伸長の調節にも関与している（Gallie 2013a）。また、還元剤として植物体内の酸化還元バランスの調節や、活性酸素を消去することを介して光合成や呼吸にも関与している（Gallie 2013a）。一方、傷害や低温などの非生物的ストレスに応答して AsA 蓄積量が増加することが、*A. thaliana*、ホウレンソウ（*Spinacia oleracea*）及びコマツナ（*B. campestris*）で報告されている（Suza et al. 2010; Tamura 1999）。おそらくこれらの非生物的ストレスによって生成される活性酸

素（ROS）を消去するためであると考えられている。しかし、これらの AsA 蓄積量増加のメカニズムは十分明らかになっていない（Suza et al. 2010）。Wolucka et al.（2005）は *N. tabacum* にジャスモン酸メチル（MeJA）を処理すると AsA 蓄積量が増加すると報告した。*N. tabacum* 懸濁細胞を用いた実験で、AsA 合成やリサイクル経路に関与する酵素遺伝子の MeJA 処理による発現量変化を調べたところ、合成経路の酵素遺伝子の発現が上昇することが明らかになっており、非生物的ストレスによる AsA 蓄積量増加は JA シグナルを介して植物体内での AsA の合成が促進された結果ではないかと考えられている。一方、生物的ストレスによる AsA 蓄積量増加の報告として CMV の弱毒系統を接種したトマトや *Pepper mild mottle virus*（PMMoV）の弱毒系統を接種したピーマンにおいて AsA 蓄積量が 30-40%増加するという報告がある（Kanda and Tsuda 2008; Sayama 2003; Tsuda et al. 2005）。しかし、弱毒系統の感染では細胞死は起こらないため活性酸素が生じることはなく、植物が何のために AsA 蓄積量を増加させるのか、またどのようなメカニズムで増加させるのかについては明らかになっていない。

RNA サイレンシングとは、ウイルスの侵入に対する植物の防御機構である。ウイルスが植物に侵入し、宿主植物の機構を利用して複製を始めると、複製中間体として二本鎖 RNA ができる。植物は細胞内でこの二本鎖 RNA を特異的分解酵素である DCL によって、21～24 ヌクレオチドの siRNA に切断する。siRNA は RISC と呼ばれるタンパク質複合体に取り込まれ、RISC はこの siRNA と相補的な RNA を細胞内で探し出し、RISC を構成する AGO によってそれを切断する。ウイルス由来の siRNA であれば、ウイルス RNA を切断することとなるため、RNA サイレンシングはウイルス増殖に対する防御機構として機能している。しかし、ウイルスは RNA サイレンシングに対するカウンター攻撃として RNA サイレンシングサプレッサー（RSS）を生産し、siRNA、DCL あるいは AGO に結合させることで RNA サイレンシング機構を抑制している。Shimura et al.（2008）は、*in vitro* におけるスクリーニングにより RSS と siRNA の結合を阻害する物

質として AsA を見出し、AsA に抗ウイルス性があることを示した。

AsA は植物細胞内に比較的多量に含まれる物質であること、外生 AsA には抗ウイルス作用があること（Shimura et al. 2008）及び弱毒系統ではあるが CMV や PMMoV に感染したトマトやトウガラシの果実で AsA 蓄積量が増加することを考え合わせると（Sayama 2003; Tsuda et al. 2005）、植物のウイルスに対する防御機構の一つとして AsA の蓄積を誘導する機構の存在が考えられる。この AsA を介したウイルスに対する防御反応の誘導機構について明らかにすることは、前章で扱った高度抵抗性など不明な点の多いウイルス抵抗性の機構を理解する上でも、また AsA を抗ウイルス剤として利用する上でも重要であると思われる。そこで本章では、前章で用いた *B. rapa* と TuMV の系を用いて *B. rapa* においても TuMV の感染により AsA の蓄積量が増加するのか、また増加する場合品種間でどの程度変異があるのか調べた。その結果、*Rnt1-1* による高度抵抗性を示す品種において特に顕著な AsA 蓄積量の増加が認められたことから、本章ではこの高度抵抗性と連動した AsA 蓄積量増加に着目し、その誘導メカニズムを明らかにする目的で研究を行った。

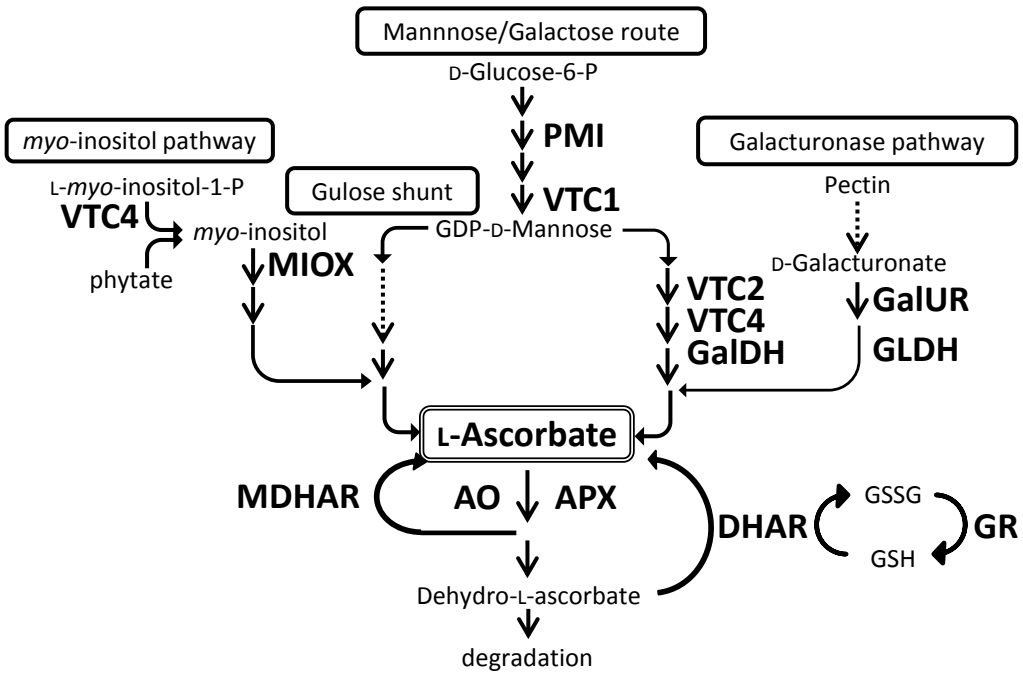



**Figure 4** Pathways involved in ascorbic acid (AsA) synthesis, oxidation and recycling in plants.

Proposed AsA biosynthetic pathways and ascorbate-glutathione cycle in plants. Arrows indicate a series of enzymatic reactions on each pathway and the genes encoding each enzyme studied in this study were described on the pathways. MIOX: *myo*-inositol oxgenase, PMI: phosphomannnose isomerase, VTC1: GDP-mannose pyrophosphorylase, VTC2: GDP-galactose phosphorylase, VTC4: L-galactose-1-P phosphatase, GalDH: L-galactose dehydrogenase, GalUR: D-galacturonate reductase, GLDH: L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase, APX: ascorbate peroxidase, tAPX: APX localized at thylakoid, AO: ascorbate oxidase, MDHAR: monodehydroascorbate reductase, DHAR: dehydroascorbate reductase, GR: glutathione reductase.

## 材料と方法

1. 材料

(1) 供試ウイルス

*Turnip mosaic virus*（TuMV）のアブラナ系統（UK1）及び、UK1 に由来する突然変異系統で *Rnt1-1* を持つ「秋まさり」に病原性となる UK1m2 系統を用いた。また、TuMV のダイコン系統（TuR1）に黄色蛍光タンパク質（YFP）をつなぎ、ウイルスの複製とともに YFP が生産される形質転換ウイルス（TuMV-TuR1-YFP）を用いた。接種源はカブ品種「雪姫かぶ」で継代したものを用いた。「雪姫かぶ」はグロースチャンバー（温度 21℃、12 時間日長）で育成した。

(2) 供試植物

*Rnt1-1* を持つハクサイ品種「秋まさり」及び「空海 65」（犬飼未発表）、*rnt1-2* をもつハクサイ品種「優春」並びに *rnt1-3* を持つカブ品種「早生大蕪」及び「雪姫かぶ」の 5 品種を用いた。

*Arabidopsis thaliana* 野生型 Columbia（Col-0）及び Ascorbate oxidase 遺伝子（At5g21100）欠損変異体 SALK_108854 を用いた。変異体は Arabidopsis Biological Resource Center より入手した。

2. 方法

(1) 植物個体の養成

植物は MLR-350 グロースチャンバー（SANYO）で 21°C、12 時間日長、150 μmol/m/s で育成した。

(2) ウイルスの接種

ハクサイ及びカブは播種後約 1 週間の展開した子葉に、*A. thaliana* は播種後約 4 週間のよく展開したロゼッタ葉に汁液接種を行った。接種は第 3 章の方法と同様に行った。

(3) 総アスコルビン酸（AsA）及び酸化型アスコルビン酸（DHA）蓄積量の測定

植物組織の 5 倍量の 6%メタリン酸溶液で植物組織を磨砕し、室温、14,000 rpm で 20 分遠心した。上清をとり、総 AsA 測定時はこれを 5%メタリン酸で 10 倍希釈し、DHA 測定時は 5%メタリン酸で 5 倍希釈して 60 µl の検液とした。検液は検体と盲検体を準備した。総 AsA 測定時には 0.2% 2,6-ジクロロインドフェノール溶液、DHA 測定時には 5%メタリン酸を 10 µl 加えてよく混ぜ、5 分おいた。1%塩化第一すず-5%メタリン酸溶液を加えてよく混ぜた。検体にヒドラジン液（2,4-ジニトロフェニルヒドラジン 0.4 g、濃硫酸 5 ml、up to 20 ml）を 30 µl 加え、37°C で 3 時間インキュベートした。インキュベート後、氷中で冷却し、85%濃硫酸を 150 µl 加えた。盲検体にはヒドラジン液を 30 µl 加えた。よく混ぜて室温で 30 分放置した。530 nm の吸光値を測定した。0, 10, 20, 40 µg/ml の AsA 溶液を用いた検量線をとり、AsA 量への換算を行った。

(4) ELISA

96 穴マイクロプレートを用意し、1 穴あたり 200 µl となるように必要な抗体溶液量を計算した。抗体溶液は抗 TuMV γ-グロブリン（O.D.=1.4）を 0.05 M 炭酸ナトリウム緩衝液（pH 9.6）で 1000 倍に希釈して作成した。希釈した抗体溶液をマイクロプレート 1 穴当り 200 µl ずつ分注した。マイクロプレートの上面をパラフィルムで密封し、37℃で 3～4 時間静置してマイクロプレートに抗体を吸着させた。PBS-T 溶液（NaCl 8 g, $KH_2PO_4$ 0.2 g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2.9 g, KCl 0.2 g, $NaN_3$ 0.2 g, Tween-20 0.5 ml, up to 1 L）でプレートを 3 回洗浄した。新鮮な葉組織を 0.05～0.1 g 用意し、葉組織を PBS-T 溶液（葉

組織 0.1 g 当り 1 ml）でよく磨砕した。磨砕液を 10,000 rpm、4°C で 10 分間遠心した。遠心後、氷中に置いた。プレートに上清を 1 穴あたり 200 µl 分注した。マイクロプレートの上面をパラフィルムで密封し、4°C で一晩インキュベートした。溶液を捨て、PBS-T 溶液でプレートを 5 回洗浄した。抗 TuMV γ-グロブリンアルカリフォスファターゼコンジュゲート（1mg/ml, 1%BSA）を PBS-T 溶液で 1000 倍に希釈した。希釈した抗体溶液をマイクロプレート 1 穴当り 200 µl ずつ分注した。マイクロプレート上面をパラフィルムで密封し、37°C で 3～4 時間インキュベートした。抗体溶液を捨て、PBS-T 溶液でプレートを 4 回洗浄した。基質溶液（p-ニトロフェニルりん酸二ナトリウムを 10%ジエタノールアミン（pH 9.8）に 1 ml あたり 1 mg を溶解）をマイクロプレート 1 穴当り 200 µl ずつ分注した。マイクロプレートの上面をパラフィルムで密封し、37°C でインキュベートし、発色させた。405 nm における吸光値を測定した。

(5) 定量 RT-PCR

葉組織からの Total RNA の抽出は第 3 章と同様に行った。定量 RT-PCR は GenomeLAB GeXP Start Kit（Beckman Coulter）を用い、添付のプロトコールに従いつつ、改良を加えて行った。これは、競合 PCR により一度に複数の遺伝子の発現量を解析することができる。予備的な実験により、それぞれの遺伝子発現解析に用いるリバースプライマーは 1～1000 nM で調整した。逆転写（RT）反応は 48°C 1 分、37°C 5 分、42°C 60 分、95°C 5 分で行った。マルチプレックス PCR は RT 産物 9.3 µl、5×PCR buffer （ユニバーサルフォワードプライマー及び dNTP が含まれる）4 µl、フォワードプライマー（各プライマーは 20 nM で調整）2 µl、Thermo-Start DNA polymerase（ABgene） 0.7 µl、25 mM $MgCl_2$ 4 µl により、95°C 10 分の後、94°C 30 秒、55°C 30 秒、68°C 1 分を 35 サイクルで PCR 反応させた。すべてのフォワードプライマーの 5’ 側には 5’-AGGTGACACTATAGAATA-3’の 18 ヌクレオチドがついており、PCR 反応において

ユニバーサルフォワードプライマーがこの配列にアニールする。3'側は各遺伝子特異的な配列となっている。96-well CEQ electrophoresis plate（Beckman Coulter）に 1 ウェルあたり CEQ sample loading solution（Beckman Coulter）38 μl、PCR 産物 1μl、CEQ DNA size standard 400 1 μl（Beckman Coulter）を入れ発現解析を行った。発現解析は Beckman CEQ 8800 及び解析ソフト eXpress profiling analysis により行った。解析したデータは内部標準として設定した 3 遺伝子 *PP2A*, *actin8* 及び *TIP41* の数値の相乗平均を算出し、この値を用いて標準化した。用いたプライマー配列を Table 6 に示す。

(6) APX, DHAR, AO 及び MDHAR の活性測定

① APX 活性測定

葉サンプルの 10 倍量の磨砕バッファー（50 mM HEPES, 0.5 mM AsA, 0.5% Triton X-100, 20%ソルビトール）で磨砕した。磨砕時に液量の 5%（w/v）ポリアミドを加えた。磨砕液を 4°C、14,000 rpm で 15 分遠心し、上清を取りさらに 30 分遠心した。これを粗酵素液とした。0.1 M リン酸カリウムバッファー（pH 7.0） 1 ml、5 mM AsA 100 μl、50 mM EDTA 40 μl、$dH_2O$ 535 μl、1 mM $H_2O_2$ 200 ml、粗酵素液 125 μl を混ぜ、直ちに 290 nm の吸光値を測定した。AsA の酸化による値の減少を APX の活性として算出した。1 分間で 1 μmol の AsA を酸化する酵素量を 1 ユニットとして数値化した。

② DHAR 活性測定

葉サンプルの 10 倍量の磨砕バッファー（0.1 M リン酸バッファー（pH 7.5）7.5 ml、Triton X-100 75 μl、0.5 M EDTA 30 μl、ソルビトール 3 g、up to 15 ml）で磨砕した。磨砕時に液量の 5%（w/v）ポリアミドを加えた。磨砕液を 4°C、14,000 rpm で 15 分遠心し、上清を取りさらに 30 分遠心した。これを粗酵素液とした。0.1 M リン酸カリウムバッファー（pH 7.0）1 ml、5 mM DHA 200 μl、50 mM 還元型グルタチオン 200 μl、50

mM EDTA 40 µl、$dH_2O$ 497.5 µl、粗酵素液 62.5 µl を混ぜ、直ちに 265 nm の吸光値を測定した。DHA が還元され AsA が生成されることによる数値の増加を DHAR の活性として算出した。グルタチオンによっても DHA 還元により AsA が生成されるため、粗酵素液を磨砕バッファーに置き換えた測定も行い、この数値を差し引いた。1 分間で 1 µmol の AsA を生成する酵素量を 1 ユニットとして数値化した。

③ AO 活性測定

0.5 mM EDTA 及び 0.75 M NaCl を含む 0.1 M リン酸バッファー（pH 5.6）10 ml に Triton X-100 50 µl、ソルビトール 2 g を溶解したものを磨砕バッファーとした。葉サンプルの 10 倍量の磨砕バッファーで磨砕し、磨砕時に液量の 5%（w/v）ポリアミドを加えた。磨砕液を 4°C、14,000 rpm で 15 分遠心し、上清を取りさらに 30 分遠心した。これを粗酵素液とした。0.5 mM EDTA を含む 0.1 M リン酸バッファー（pH 5.6）1.775 ml、5 mM AsA 100 µl、粗酵素液 125 µl をよく混ぜ、直ちに 265 nm の吸光値を測定した。AsA の酸化による値の減少を AO の活性として算出した。1 分間で 1 µmol の AsA を酸化する酵素量を 1 ユニットとして数値化した。

④ MDHAR 活性測定

葉サンプルの 10 倍量の磨砕バッファー（DHAR 活性測定用と同組成）で磨砕した。磨砕時に液量の 5%（w/v）ポリアミドを加えた。磨砕液を 4°C、14,000 rpm で 15 分遠心し、上清を取りさらに 30 分遠心した。これを粗酵素液とした。0.1 M TES バッファー 1 ml、5 mM NAD(P)H 40 µl、10 mM AsA 500 µl、8 U/ml ascorbate oxidase 250 µl、$dH_2O$ 85 µl、粗酵素液 125 µl をよく混ぜ、直ちに 340 nm の吸光値を測定した。NAD(P)H の酸化による吸光値の減少を MDHAR の活性として算出した。1 分間で 1 µmol の NAD(P)H を酸化する酵素量を 1 ユニットとして数値化した。

(7) 植物ホルモン及び類縁体蓄積量の測定

植物ホルモン及び類縁体の蓄積量測定は、タンデム質量分析法を用いた高速液体クロマトグラフィにより、Matsuura et al.（2009）の報告に従って行った。

**Table 6** Primer's sequences used for quantitative RT-PCR

| Primer name | | Primer's sequence (5'→3') |
|---|---|---|
| BrPP2A -F | Forward | AGGTGACACTATAGAATAATTTGATGCAATATTCTGAACTCTCA |
| BrPP2A -R | Reverse | GTACGACTCACTATAGGGAACAACTTAGGCTGTTTGCATGA |
| BrTIP41-F | Forward | AGGTGACACTATAGAATAACCTGAGGGGGAAGCTAGTC |
| BrTIP41-R | Reverse | GTACGACTCACTATAGGGACTCCATTGTCAGCCAGTTCA |
| BrACT8-F | Forward | AGGTGACACTATAGAATAACATTCCAGCAGATGTGGATCTC |
| BrACT8-R | Reverse | GTACGACTCACTATAGGGAAACCCAGAGAGTTTTGTCACAC |
| BrMIOX-F | Forward | AGGTGACACTATAGAATAGCTGGCTATGAAGTAATTAGTCCTG |
| BrMIOX-R | Reverse | GTACGACTCACTATAGGGAACTCGCTATGGATGATTGTGA |
| BrVTC1-F | Forward | AGGTGACACTATAGAATATTTTCATCTTTGTGCTTTCGG |
| BrVTC1-R | Reverse | GTACGACTCACTATAGGGATTACAAAACACCAAATGACTTTTAAC |
| BrVTC2-F | Forward | AGGTGACACTATAGAATATTCTCCGGCGAAAATTGG |
| BrVTC2-R | Reverse | GTACGACTCACTATAGGGATGCGGCAAAGGGTTAGTCT |
| BrVTC4-F | Forward | AGGTGACACTATAGAATAAAGCTGGACAGGTGATTCGT |
| BrVTC4-R | Reverse | GTACGACTCACTATAGGGAACCATTCGCAGCTGTTGTTT |
| BrGalDH-F | Forward | AGGTGACACTATAGAATATGGGAAACACAGGTCTCAAA |
| BrGalDH-R | Reverse | GTACGACTCACTATAGGGATTAATGCCTTGTCGGAACG |
| BrGalUR-F | Forward | AGGTGACACTATAGAATATGAAGTGGAGGAATGCAAGA |
| BrGalUR-R | Reverse | GTACGACTCACTATAGGGAGCAGTCAAAACAATGCCCTT |
| BrGLDH-F | Forward | AGGTGACACTATAGAATAATACGCAGCACTGGCTCTCT |
| BrGLDH-R | Reverse | GTACGACTCACTATAGGGAGTCTCCGGCTGGTTAAAGTTC |
| BrAPX3a-F | Forward | AGGTGACACTATAGAATAACAACATAGTATGACCTGGATTAAAGA |
| BrAPX3a-R | Reverse | GTACGACTCACTATAGGGAGAGCCACGAAGCAAAAGATT |
| BrAPX3b-F | Forward | AGGTGACACTATAGAATACAACGTCTACAGTCACTATGGC |
| BrAPX3b-R | Reverse | GTACGACTCACTATAGGGAGAGAAGAGAAGGGGAATGCGT |
| BrAPX4-F | Forward | AGGTGACACTATAGAATACTGCATTGACAAAGCTAAGTGG |
| BrAPX4-R | Reverse | GTACGACTCACTATAGGGATTGTTGTCACGCTTATGCTCA |
| BrtAPXa-F | Forward | AGGTGACACTATAGAATATTCCACCCAAAAGAAAGAGC |
| BrtAPXa-R | Reverse | GTACGACTCACTATAGGGAACAAGAGGACCAAAACGCTG |
| BrtAPXb-F | Forward | AGGTGACACTATAGAATACACTTGTCGAGGGAACTTTTC |
| BrtAPXb-R | Reverse | GTACGACTCACTATAGGGATAGCTAAGGGCCTCAACGAA |
| BrAOa-F | Forward | AGGTGACACTATAGAATAAATCCAACCCCTTCCAGA |
| BrAOa-R | Reverse | GTACGACTCACTATAGGGACGCCCATTTTGTGTACTTATC |
| BrAOb-F | Forward | AGGTGACACTATAGAATAAATCCGCACGTCCATCTCT |
| BrAOb-R | Reverse | GTACGACTCACTATAGGGAGTAGCTAAGCGTGTTCAACCC |
| BrAOc-F | Forward | AGGTGACACTATAGAATAGGGAAGAAAGAGCCATTGA |
| BrAOc-R | Reverse | GTACGACTCACTATAGGGATGTTGGTAACGATGTGCTGC |

| | | |
|---|---|---|
| BrMDHAR-F | Forward | AGGTGACACTATAGAATAGGTGAGTCAGCATATAGTTCCAG |
| BrMDHAR-R | Reverse | GTACGACTCACTATAGGGAGAGGCTTCTCCATCATCACCA |
| BrDHAR1-F | Forward | AGGTGACACTATAGAATAACTAGTTCCATCTGCTCCGC |
| BrDHAR1-R | Reverse | GTACGACTCACTATAGGGAAGCATAATAGATTGTTTGGTTAGAACA |
| BrDHAR2-F | Forward | AGGTGACACTATAGAATACGTGCGAAATCTGAAGATCG |
| BrDHAR2-R | Reverse | GTACGACTCACTATAGGGACGGAGACGTTAGCGAGATGA |
| BrGR1-F | Forward | AGGTGACACTATAGAATACACACACCATCTTAGAGAGTTTGG |
| BrGR1-R | Reverse | GTACGACTCACTATAGGGATCATAGTGAGTCTCGGTTGTAGC |

## 結果

### *Rnt1-1* 抵抗性と連動したアスコルビン酸蓄積量の増加

TuMV-UK1 系統に対して *Rnt1-1* による高度抵抗性を示すハクサイ品種「秋まさり」及び「空海 65」、*rnt1-2* により全身えそを示す「優春」及び *rnt1-3* によりモザイクを示すカブ品種「早生大蕪」及び「雪姫かぶ」を用いて UK1 接種後 4 日目のアスコルビン酸蓄積量を Mock 区と比較した。なお、アスコルビン酸には還元型アスコルビン酸の他に酸化型アスコルビン酸であるデヒドロアスコルビン酸が存在するため、ここでは還元型アスコルビン酸を AsA、酸化型アスコルビン酸を DHA と表記し、両者を合わせた総アスコルビン酸を総 AsA と表記した。*Rnt1-1* を持つ「秋まさり」では Mock 区に比べ接種区で総 AsA 蓄積量が有意に 62%増加し、同じく *Rnt1-1* を持つ「空海 65」でも有意に 50%増加した（Figure 5）。感受性となる組合せでは、モザイク病徴を示す「早生大蕪」では有意な増加は認められず、同じくモザイク病徴を示す「雪姫かぶ」では有意に 18%増加した（Figure 5）。一方、*rnt1-2* により全身えそを示す「優春」は有意に 17%減少した（Figure 5）。このように顕著な総 AsA 量の増加は、抵抗性の組合せにおいて特異的に生じることが明らかとなった。

次に 50~60%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 量が野生型の Col-0 に比べて約 33%増加することが判明しているアスコルビン酸オキシダーゼ（*ao*）（Yamamoto et al. 2005）変異体のウイルス耐性について調べた。そもそも AO はアポプラストに局在して AsA からモノ酸化型アスコルビン酸（MDHA）への酸化を触媒する酵素であり、AO の活性が抑えられることで AsA から MDHA への酸化が抑制されるため AsA 蓄積量が増加する。Col-0 と *ao* 変異体各 6 個体に黄色蛍光タンパク質（YFP : yellow fluorescent protein）を組み込んだ TuMV 系統 TuR1-YFP No. 5 を接種し、非接種上位葉において YFP 蛍光が認められた葉組織のみサンプリングして ELISA によるウイルス蓄積量の比較を行ったところ、*ao* 変異体では ELISA 値で約 20%減少していることが示された

（Figure 6）。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が有意に増大するものと考えられた。

そこで、この総 AsA 蓄積量の増加と *Rnt1-1* による高度抵抗性との関係を明らかにする目的で、まずUK1及びUK1m2（UK1に由来する突然変異系統で「秋まさり」に病原性）をそれぞれ「秋まさり」に接種して、接種後の総AsA量を継時的に測定した（Figure 7）。その結果、感受性の組み合わせではAsA蓄積量が増加する傾向は認められないが、抵抗性の組み合わせにおいてMock区に対して接種3日目で有意に40%、6日目で有意に35%増加するという結果を得た。以上の結果から、*Rnt1-1* による抵抗性反応と連動して AsA 蓄積量が増加すること及びこの増加が接種後 3 日目から起こることが明らかとなった。

植物体内での AsA 合成には主要経路であるマンノース／ガラクトース経路の他、ミオイノシトール経路、グロース経路、ガラクツロン経路の少なくとも 3 つの経路が関与することが明らかとなっている（Gallie 2003a）。また、AsA が抗酸化物質として作用する場合には活性酸素を消去するために酸化酵素であるアスコルビン酸パーオキシダーゼ（APX）や AO の基質として働き AsA 自身が酸化されることで活性酸素を消去する。酸化された AsA は酸化型 AsA である DHA や MDHA となるが、これらを還元酵素であるデヒドロアスコルビン酸リダクターゼ（DHAR）やモノデヒドロアスコルビン酸リダクターゼ（MDHAR）によってリサイクルする経路も存在しており（Figure 4）、この還元経路の促進によっても AsA 蓄積量が増加することが報告されている（Chen et al. 2003; Wang et al. 2010）。上述の、抵抗性と連動した AsA 蓄積量の増加にいずれの経路が関与しているのかを明らかにするため、これらの経路に関与する酵素のうち遺伝子の配列が明らかになっているものを用いて酵素遺伝子の発現量の解析を行った。Figure 7 においてAsA蓄積量を測定した葉と同一の葉からRNAを抽出し、UK1接種直後、1日目、3日目、6 日目について各遺伝子の発現量を調べて Mock 区とウイルス接種区を比較した。合成経路上の遺伝子について見てみると、VTC4 や GLDH など一部の遺伝子で発現量が減少傾向にあったものの、増加する傾向の遺伝子は認められなかった（Figure 8）。一方、酸化経路で

は、APX4 や tAPX 遺伝子の発現量が接種後 3 日目においてウイルス接種区でいずれも約 40%減少していることが明らかとなった（Figure 8）。さらに還元経路については、DHAR1 遺伝子の発現量が接種後 3 日目においてウイルス接種区で約 30%増加していることが明らかとなった（Figure 8）。これらの結果から、AsA 蓄積量の増加は合成経路の活性化よりもむしろ酸化経路の抑制と還元経路の促進によるものではないかと予想された。そこで次に、酸化・還元酵素それぞれの酵素活性を測定した。ウイルス接種後 1, 3, 5, 7 日目に接種葉におけるウイルス接種区及び Mock 区での APX, AO, DHAR 及び MDHAR の酵素活性を測定し、比較した。APX の活性はウイルス接種 5 日目においてウイルス接種区で 23%減少していた（Figure 9）。また、AO の活性もウイルス接種 5 日目においてウイルス接種区で 28%減少していることが示された（Figure 9）。一方、DHAR については、ウイルス接種 5 日目において Mock 区に比べてウイルス接種区で 38%増加していることが示された（Figure 9）。MDHAR についてはわずかに減少する傾向にあった（Figure 9）。これらの結果から、*Rnt1-1* による高度抵抗性と連動した AsA 蓄積量の増加は、AsA の酸化抑制と DHA の還元促進によるものであることが強く示唆された。

### アスコルビン酸含量とウイルス耐性との関係

*Rnt1-1* 抵抗性と連動した AsA 蓄積量の増加は、ウイルスに対する防御反応の 1 つと考えられたことから、次にその誘導シグナルを同定するため、抵抗性誘導シグナルとして報告のある過酸化水素、サリチル酸（SA）、ジャスモン酸（JA）、アブシジン酸（ABA）が酸化・還元経路の制御に関与しているかどうか解析を行った。まず、上述の 4 つのシグナル物質を「秋まさり」に噴霧処理し、AsA 蓄積量が変化するかどうかを調べた。25 mM の過酸化水素を処理して酸化ストレスを与えた場合には処理後 1, 6, 12, 24 時間のいずれにおいても AsA 蓄積量が増加する傾向にあることが示された（Figure 10）。1, 10, 50, 100 μM の SA 処理では 24 時間後に AsA 蓄積量を測定した場合、いずれの濃度でも大きな変化は認められなかった（Figure 10）。一方、

MeJA で同じ濃度の処理を行ったところ、10 μM 処理で最も AsA 蓄積量が増加し、17%増加した（Figure 10）。また、ABA 処理ではいずれの濃度でも AsA 蓄積量が Mock 区よりも減少する傾向にあり、50 μM 処理で最大 32%減少した（Figure 10）。以上の結果より、過酸化水素及び MeJA 処理によって AsA 蓄積量は増加すると考えられた。しかし、統計的に有意な差は得られなかったことから、最適と思われた条件（過酸化水素の場合 25 mM 処理で 24 時間後の測定、MeJA 処理の場合 10 μM で 24 時間後の測定）で、さらに独立した 2 回の実験を行った。3 回の結果を合わせて対応のある t 検定を行うと、いずれの処理によっても統計的に有意に AsA 蓄積量が増加していることが確認された（Table 7）。AsA 蓄積量の増加に重要と考えられた AsA の酸化・還元経路に、過酸化水素や MeJA がどのような影響を与えるのか、遺伝子発現レベルで調べた。過酸化水素処理では、AOa の発現上昇や MDAHR の発現低下などが観察されたものの、これらは抵抗性誘導時とは異なる発現パターンであった（Figure 11a）。一方、MeJA 処理の場合は APX3a, APX3b 及び APX 4 の発現量が有意に減少するとともに、DHAR1 の発現量が有意に増加しており、抵抗性誘導時の発現パターンと類似した結果となった（Figure 11b）。一方、過酸化水素処理では AO 遺伝子の発現量は増加する傾向にあって、酵素活性レベルで見てみても、DHAR の活性が 24%減少するなど、発現解析と同様の結果が得られ、やはり抵抗性誘導時とは異なるパターンとなった（Figure 12a）。MeJA 処理では APX の活性が有意に 10%減少、DHAR の活性が有意に 9%増加し、遺伝子発現量の結果と同様に抵抗性誘導時と類似したパターンとなった（Figure 12b）。AO の活性も有意に 2.5 倍増加することが見いだされた（Figure 12b）。以上の結果から、*Rnt1-1* による抵抗性と連動した AsA 蓄積量の増加には、シグナル物質として過酸化水素や SA あるいは ABA ではなく、JA が関与しており、この JA によって APX 遺伝子の発現抑制及び DHAR 遺伝子の発現促進が誘導されているものと考えられた。一方で、抵抗性誘導時と異なり MeJA 処理では AO の活性上昇が見いだされたことから、JA 以外の未知の因子も働いていることが示唆された。

### *Rnt1-1* 抵抗性と連動したアスコルビン酸蓄積誘導の機作

前述の結果から、*Rnt1-1* による抵抗性と連動した AsA 蓄積量増加は JA を介して誘導されていると考えられた。しかし、高度抵抗性の誘導には SA 及びエチレンが関与しているとの報告があることから（Sansregret et al. 2013）、実際に *Rnt1-1* による抵抗性が誘導される際に植物ホルモンの蓄積量がどのように変化するのか接種直前、接種 6, 12, 24, 48, 72 時間後に測定した。SA 及び SA の不活性体であるサリチル酸グルコシド（SAG）については、Mock 区に比べてウイルス接種区において接種後後 6～12 時間から蓄積量が減少し始めた（Figure 13）。いずれも接種後 24 時間の時点で Mock 区に比べて最も蓄積量が低くなっており、SA は 43%、SAG は 53%の減少であった。JA は Mock 区、ウイルス接種区とも接種 24 時間後に上昇し、その後 48 時間後の時点では Mock 区に比べて蓄積量が 73%低かった（Figure 13）。一方で、JA 類縁体で JA の活性体であるジャスモン酸イソロイシン（JA-Ile）や、JA から合成される チュベロン酸（TA）及びチュベロン酸グルコシド（TAG）はウイルス接種区で蓄積量が高く推移していることが明らかとなった。Mock 区に比べてウイルス接種区で JA-Ile は接種後 24 時間で約 1.8 倍、TA は接種後 24 時間で約 2.7 倍、TAG は接種後 48 時間で約 3.6 倍の蓄積量を示した（Figure 13）。これは、一過的に生合成された JA が、速い速度でこれらの JA 類縁体などへ変換されていることを示唆している。また、ABA は接種後 6 時間からウイルス接種区では蓄積量が低い値で推移した（Figure 13）。以上の結果から、抵抗性誘導時において蓄積量が増加する物質は、JA-Ile など、JA に由来する物質であると考えられた。

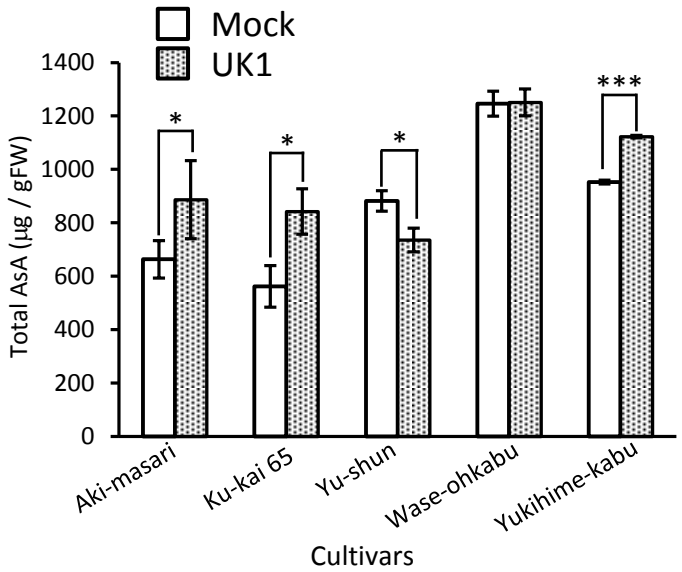



**Figure 5** Increase of AsA content in response to *Turnip mosaic virus* (TuMV) infection in *Brassica rapa* plants.

The TuMV strain UK1 was inoculated to the second true leaves of the five *B. rapa* cultivars carrying different alleles at the TuMV resistance gene locus *Rnt1* 2 weeks after sowing. The AsA contents in the inoculated leaves were measured 4 days post inoculaition. Error bars indicate standard error of biological triplicates. A single and triple asterisks indicate significance at $P<0.05$ and $P<0.001$, respectively, by Student's *t* test.

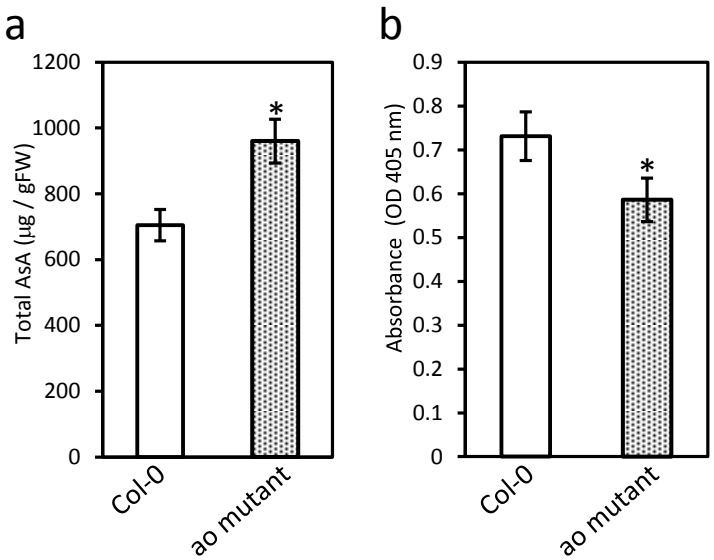



**Figure 6** Suppression of viral accumulation by the T-DNA insertion mutation in the ascorbate oxidase (AO) gene (At5g21100) of the ecotype of Col-0 in *Arabidopsis thaliana*.

a, Comparison of the total ascorbic acid contents between the *ao* mutant and the wild type Col-0. b, Viral accumulation was suppressed in the *ao* mutant inoculated with *Turnip mosaic virus* (TuMV) strain TuR1-YFP expressing yellow fluorescent protein. Three-week-old *Arabidopsis* plants were inoculated with TuR1-YFP; the infected fluorescent tissues on non-inoculated upper leaves were harvested 9 DPI under blue light and the levels of virus accumulation were measured by an enzyme-linked immunosorbent assay. A single asterisk indicates significance at $P<0.05$ by Student's *t* test.

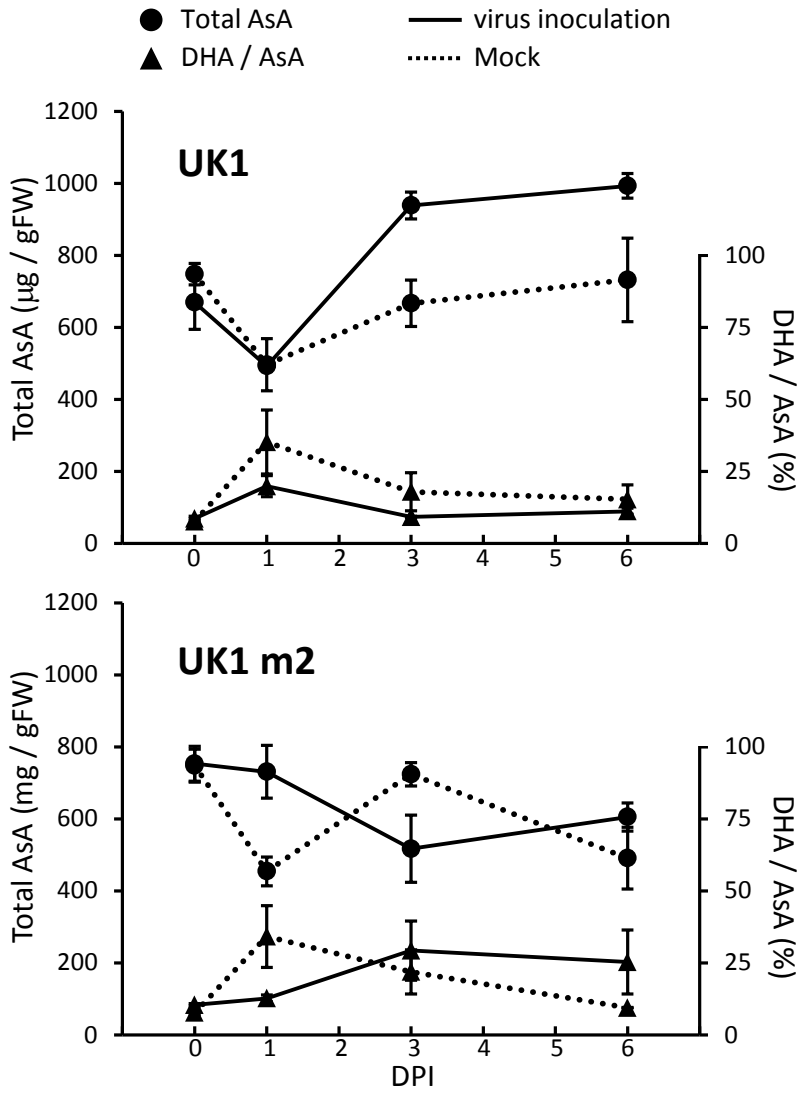



**Figure 7** Changes of total ascorbic acid (AsA) content and the ratio of dehydroascorbic acid (DHA) to AsA in *Brassica rapa* cultivar Akimasari inoculated with *Turnip mosaic virus* (TuMV) avirulent strain UK1 (upper) and virulent strain UK1-m2 (lower).

Each TuMV strain was inoculated to the second leaves of 2-week-old Akimasari plants. The contents of AsA and DHA were measured 0, 1, 3 and 6 days post inoculation (DPI). Error bars indicate standard error of biological triplicates.

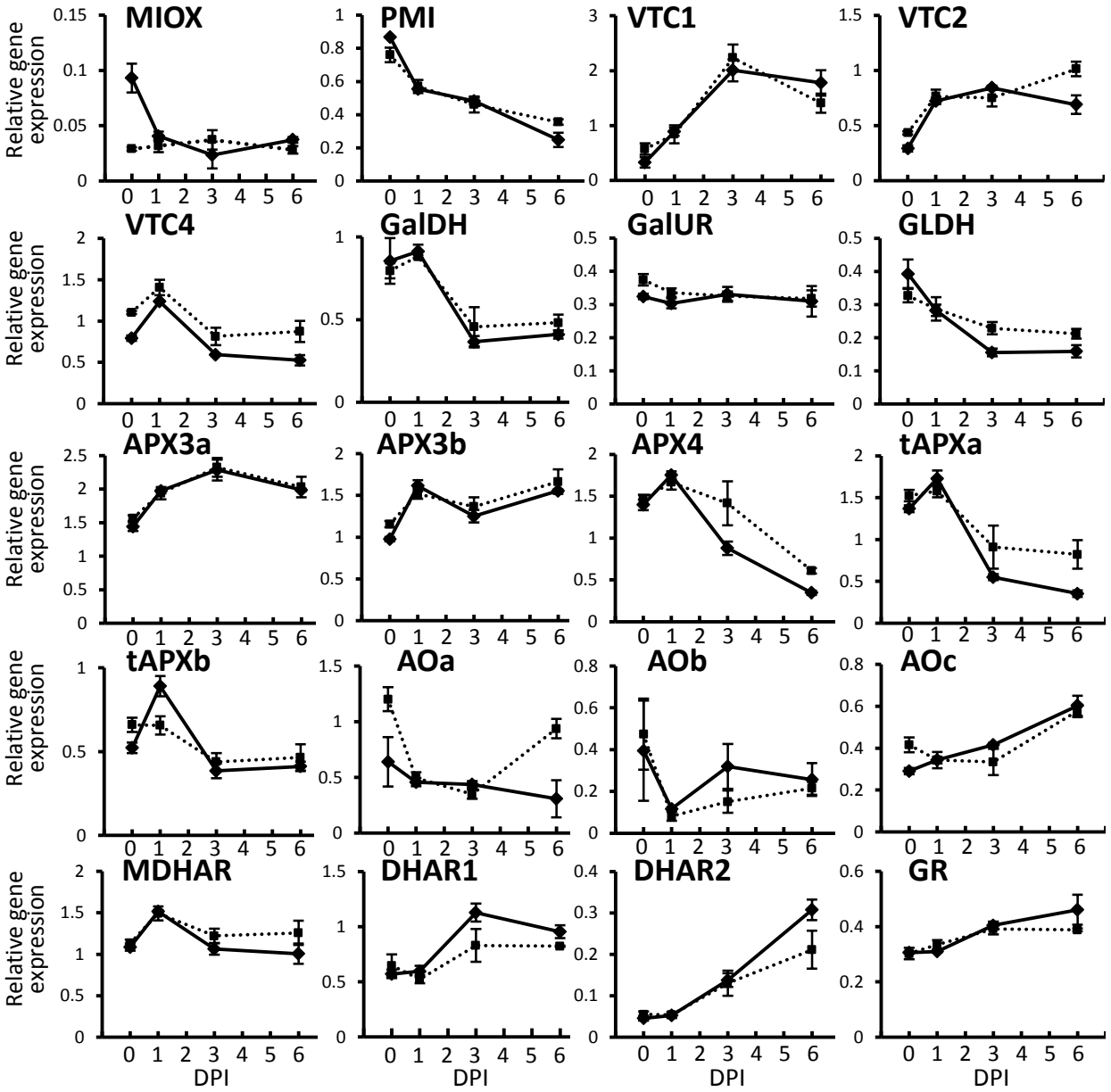

MIOX
PMI
VTC1
VTC2
VTC4
GalDH
GalUR
GLDH
APX3a
APX3b
APX4
tAPXa
tAPXb
AOa
AOb
AOc
MDHAR
DHAR1
DHAR2
GR
Relative gene expression
DPI

**Figure 8** Expression of the genes involved in ascorbic acid (AsA) synthesis, oxidation and recycling in the Akimasari plants inoculated with *Turnip mosaic virus* strain UK1.

Transcript levels were determined with quantitative RT-PCR 0, 1, 3 and 6 days post inoculation (DPI). Solid and broken lines indicate UK1 inoculated and mock-treated plants, respectively. Error bars indicate standard error of biological triplicates. MIOX: *myo*-inositol oxgenase, PMI: phosphomannnose isomerase, VTC1: GDP-mannose pyrophosphorylase, VTC2: GDP-galactose phosphorylase, VTC4: L-galactose-1-P phosphatase, GalDH: L-galactose dehydrogenase, GalUR: D-galacturonate reductase, GLDH: L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase, APX: ascorbate peroxidase, tAPX: APX localized at thylakoid, AO: ascorbate oxidase, MDHAR: monodehydroascorbate reductase, DHAR: dehydroascorbate reductase, GR: glutathione reductase.

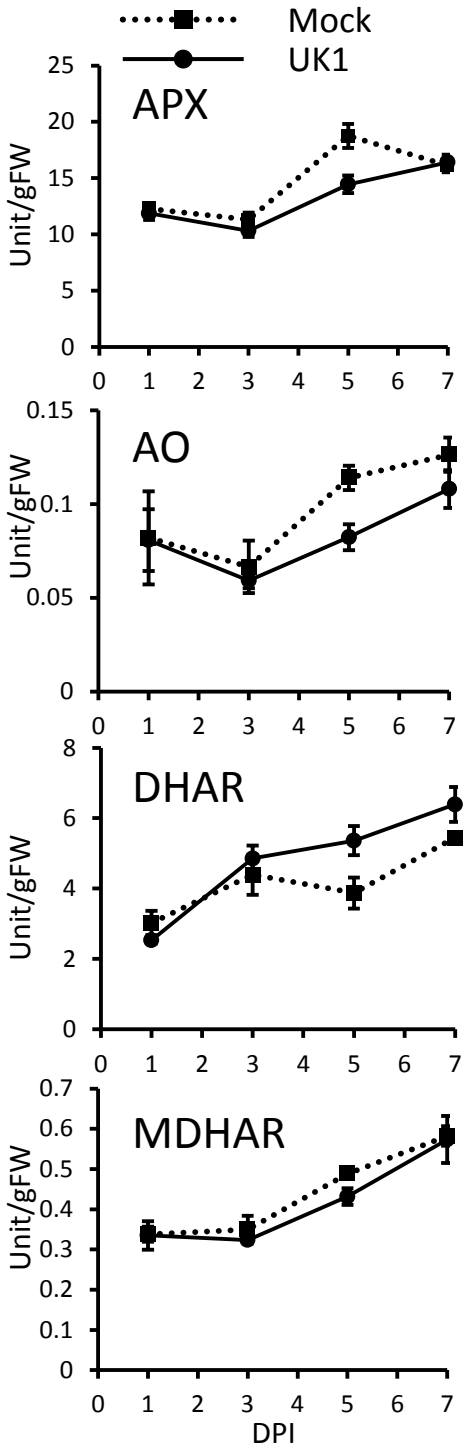



**Figure 9** Activity of the enzymes involved in AsA oxidation and recycling in the Akimasari plants inoculated with *Turnip mosaic virus* strain UK1. Enzyme activities were quantified 0, 1, 3 and 6 days post inoculation (DPI). Solid and broken lines indicate UK1-inoculated and mock-treated plants, respectively. Error bars indicate standard error of biological triplicates. APX: ascorbate peroxidase, AO: ascorbate oxidase, DHAR: dehydroascorbate reductase, MDHAR: monodehydroascorbate reductase.

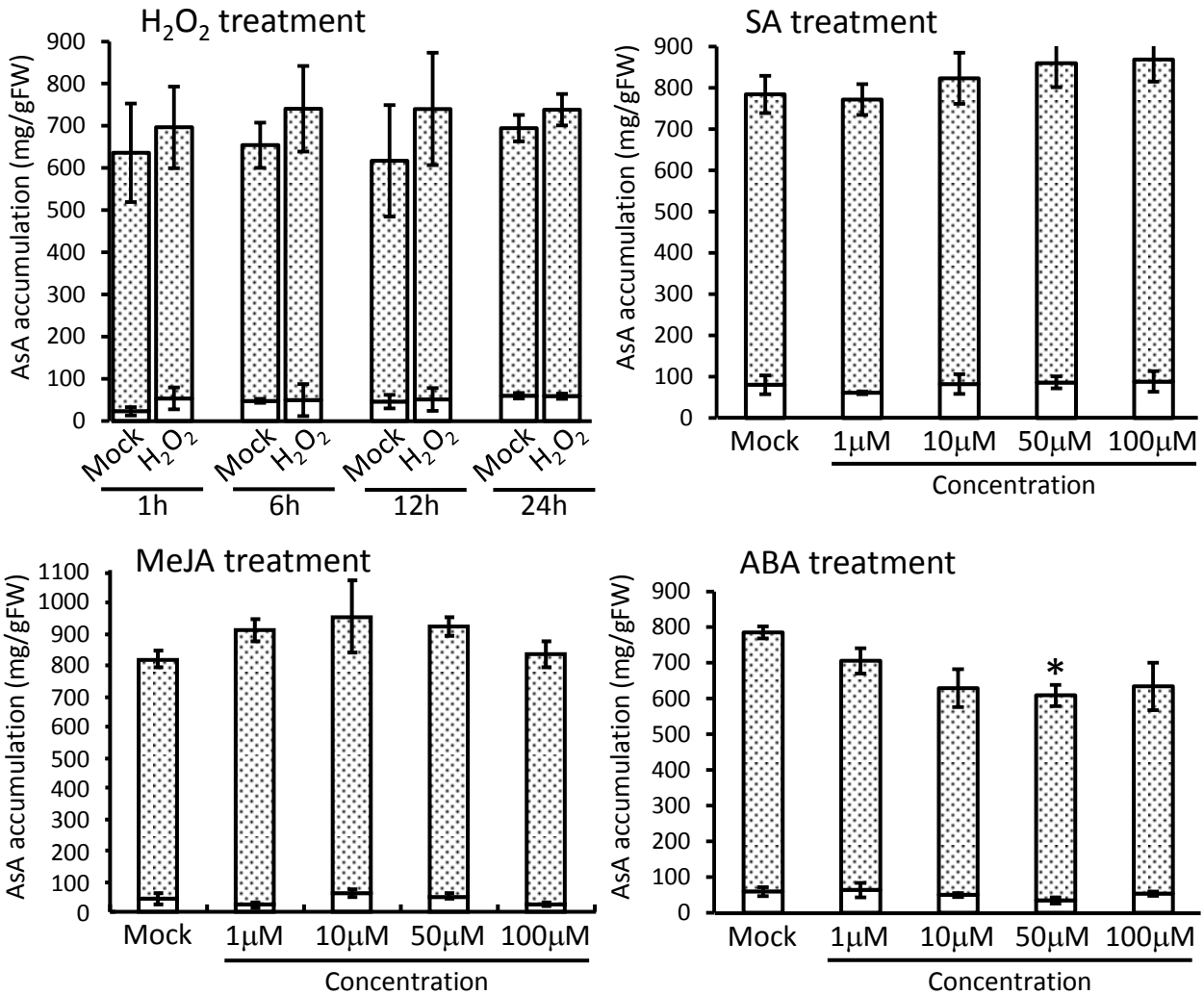


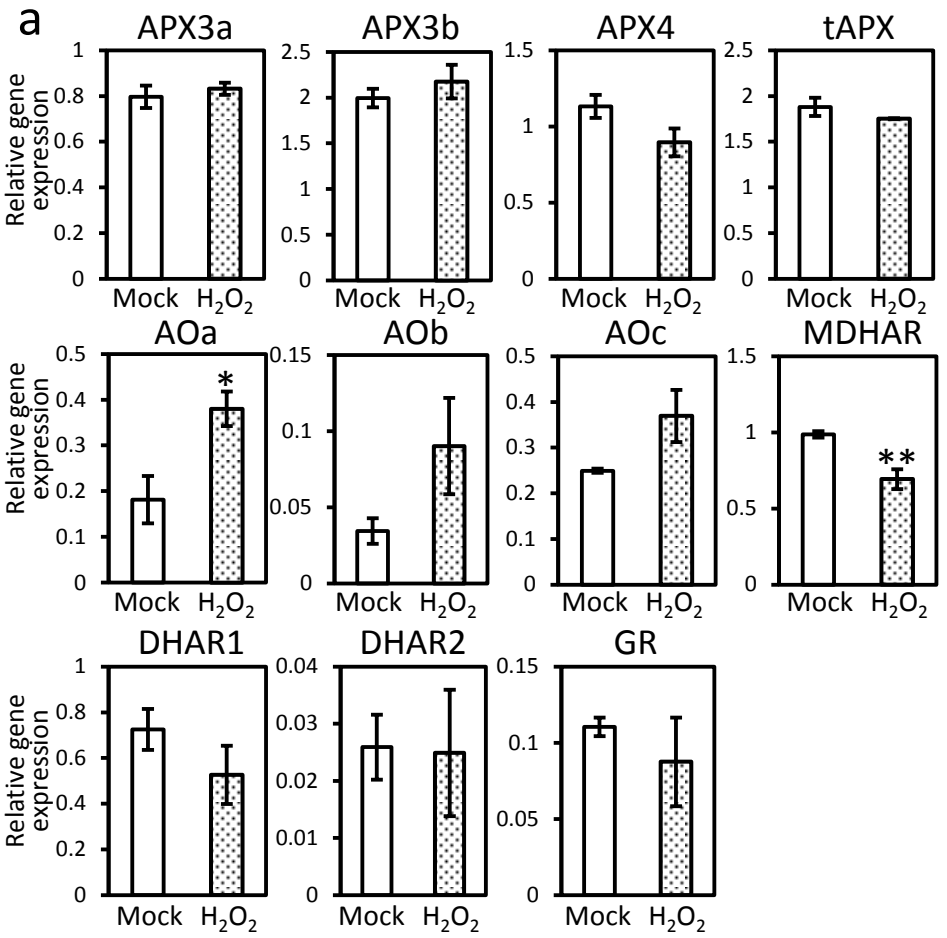

**Figure 10** Induction of ascorbic acid (AsA) accumulation by signal molecules involved in plant defense reaction.

Akimasari plants were splayed with 25 mM $H_2O_2$ solution and the second true leaves were sampled 1, 6, 12 and 24 hours after treatment. For the treatments by salicylic acid, methyl-jasmonate and abscisic acid, the second true leaves were sampled 24 hours after treatment. Grey and white colors are AsA and dehydroascorbic acid (DHA), respectively. Error bars indicate standard error of biological triplicates. A single asterisk indicates significance at $P<0.05$ by Dunnett's test.

**Table 7** Induction potency for ascorbic acid accumulation in $H_2O_2$, salicylic acid (SA) and methyl-jasmonate (MeJA)

| | Mock | $H_2O_2$* | Mock | JA* | Mock | SAns |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Exp. 1 | 694.41 | 738.28 | 818.09 | 955.29 | 783.75 | 859.09 |
| Exp. 2 | 838.85 | 897.29 | 636.62 | 684.96 | 721.62 | 626.06 |
| Exp. 3 | 418.79 | 515.15 | 804.40 | 890.04 | 781.80 | 718.20 |

* : $P$>0.05, ns : not significant
Statistical significant was calculated by Student's pared *t* test using the average values of three independent experiments.


a
APX3a
APX3b
APX4
tAPX
AOa
AOb
AOc
MDHAR
DHAR1
DHAR2
GR
Relative gene expression
Mock
H2O2
*
**

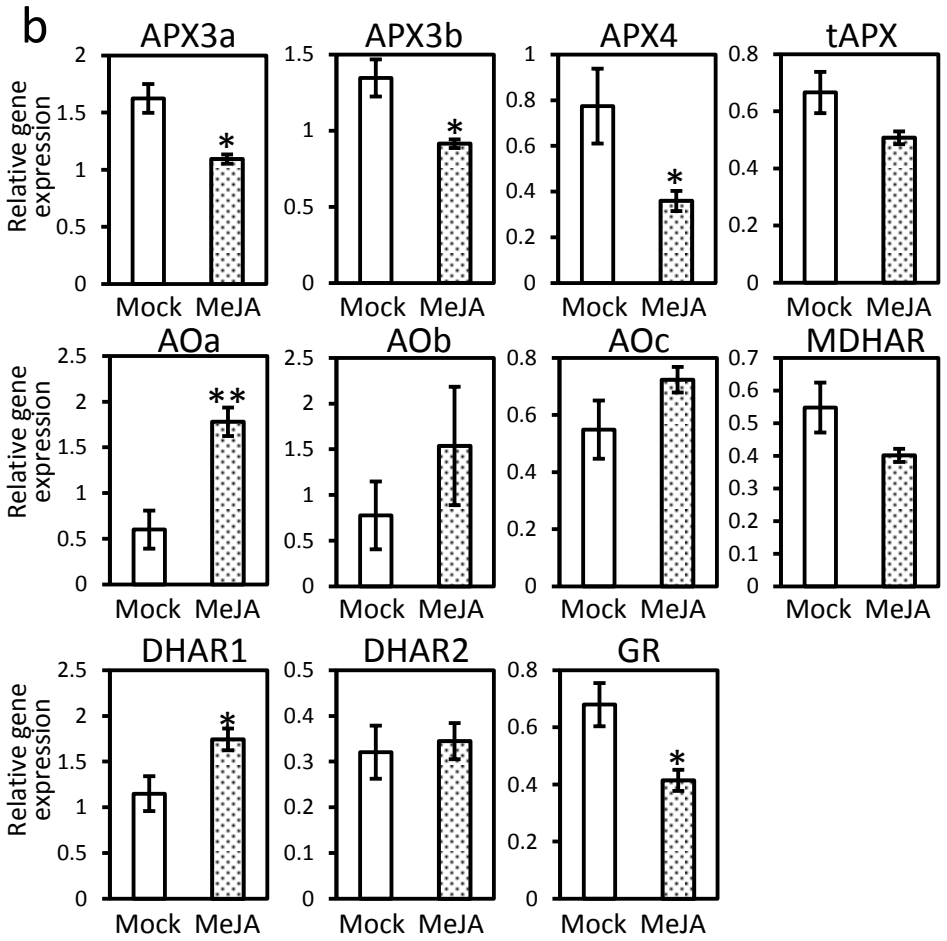

b
APX3a
APX3b
APX4
tAPX
AOa
AOb
AOc
MDHAR
DHAR1
DHAR2
GR
Relative gene expression
Mock
MeJA
*
**

**Figure 11** Alteration of expression in the genes involved in AsA oxidation and recycling in the Akimasari plants by the treatment of 25mM $H_2O_2$ (a) or 10 μM methyl-jasmonate (b).

Transcript levels were determined with quantitative RT-PCR 24 hours post treatment. Solid and broken lines indicate UK1-inoculated and mock-treated plants, respectively. Error bars indicate standard error of biological triplicates. A single and double asterisks indicate significance at $P<0.05$ and $P<0.01$, respectively, by Student's *t* test. APX: ascorbate peroxidase, tAPX: APX localized at thylakoid, AO: ascorbate oxidase, DHAR: dehydroascorbate reductase, MDHAR: monodehydroascorbate reductase, GR: glutathione reductase.

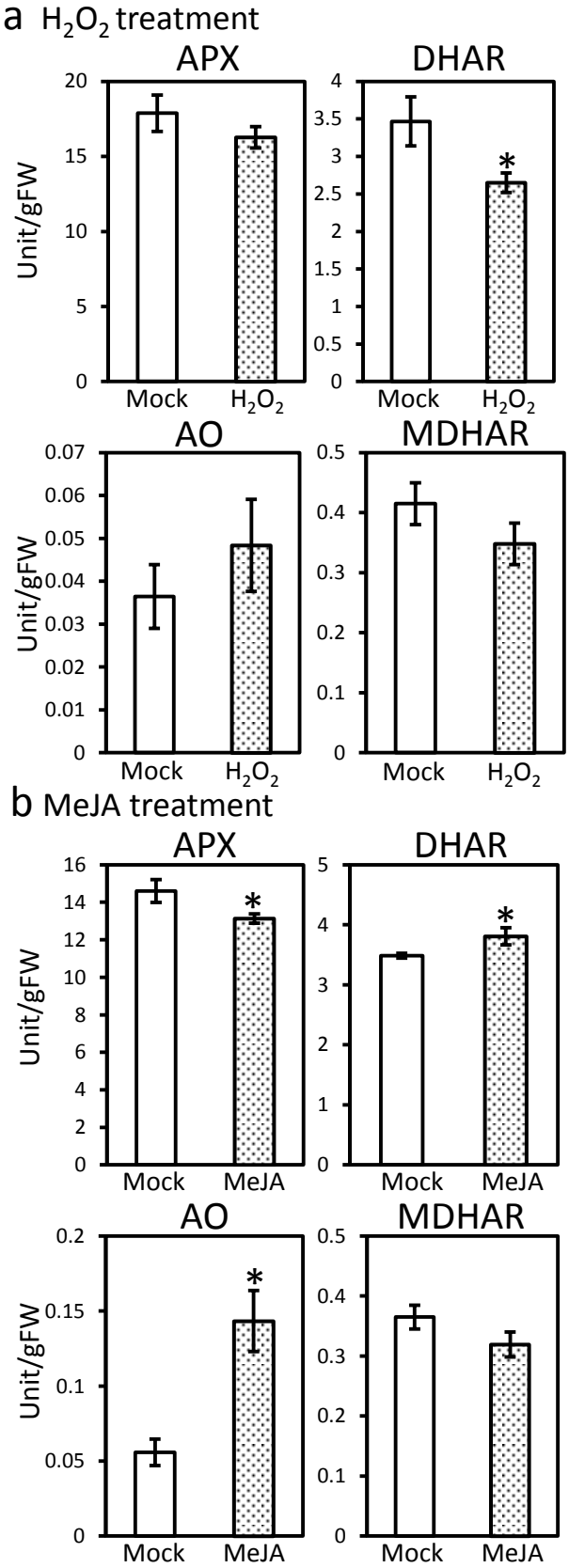



**Figure 12** Alteration of activity in the enzymes involved in AsA oxidation and recycling in the Akimasari plants by the treatment of 25 mM $H_2O_2$ (A) or 10μM methyl-jasmonate (B). Enzyme activities were quantified 24 hours post treatment. Error bars indicate standard error of biological triplicates. A single asterisk indicates significance at $P<0.05$ by Student's *t* test. APX: ascorbate peroxidase, AO: ascorbate oxidase, DHAR: dehydroascorbate reductase, MDHAR: monodehydroascorbate reductase.

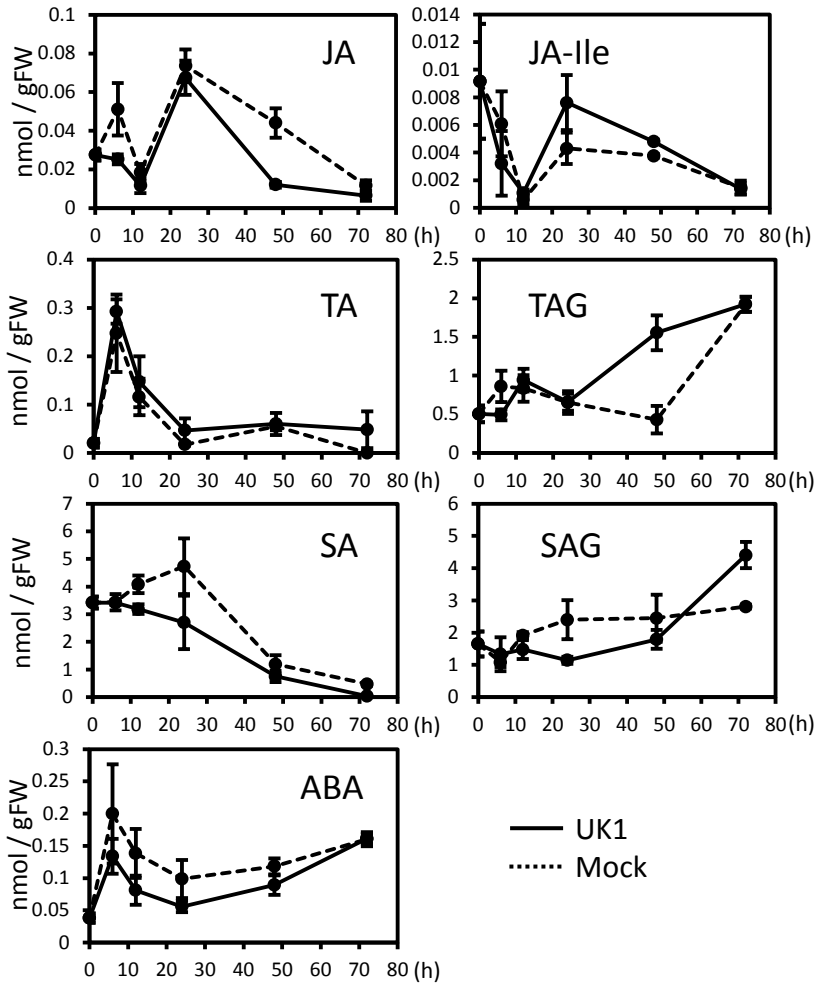



**Figure 13** Changes in contents of plant hormones and their derivatives in the Akimasari plants inoculated with the *Turnip mosaic virus* strain UK1. Content of each compound was quantified 0, 12, 24, 48 and 72 hours post inoculation (HPI). Solid and broken lines indicate the UK1 inoculated and mock-treated plants, respectively. Error bars indicate standard error of biological triplicates. JA: jasmonic acid, JA-Ile: jasmonoyl-isoleucine conjugate, TA: tuberonic acid, TAG: TA gulucoside, SA: salicylic acid, SAG: SA glucoside, ABA: abscisic acid.

## 考察

植物はウイルス感染に対する防御手段として RNA サイレンシングの機構を発達させたが、ウイルスはこの RNA サイレンシングに対する counter defense として RNA サイレンシングサプレッサー(RSS)を産生して対抗している（Peláez and Sanchez 2013a）。サプレッサーのいくつかは RNA サイレンシングの誘導に必要な siRNA に結合して RNA サイレンシングを抑制するが、Shimura et al.（2008）はこのサプレッサーと siRNA の結合を阻害する物質として AsA を見出した。AsA は植物の細胞に多量に存在する化合物であることを考えると、内生 AsA の生理機能の一つとして抗ウイルス作用があるのではないかと考えられた。一方、ウイルス感染と内生 AsA との関係については、CMV の弱毒系統を接種したトマトや PMMoV の弱毒系統を接種したピーマンにおいて AsA 蓄積量が 30-40%上昇するという報告がある（Sayama 2003; Tsuda et al. 2005; Kanda and Tsuda 2008）。AsA のサプレッサー阻害効果を合わせて考えてみると、植物は AsA の抗ウイルス作用を利用するためにウイルス感染に応答して AsA 蓄積量をさらに増加させる機構をもっているのではないかと考えられた。そこで、本研究ではまず第 3 章で扱った *Brassica* 作物と TuMV の系において同様の現象が生じるのか調べた。TuMV-UK1 接種に対して *Rnt1-1* により高度抵抗性を示すハクサイ 2 品種、*rnt1-2* により全身えそを示すハクサイ 1 品種及び *rnt1-3* によりモザイクを示すカブ 2 品種を用い、感受性の品種においてウイルスが接種葉に拡がり始めると考えられる接種後 4 日目において総 AsA 蓄積量の測定を行った。その結果、感受性の 3 品種ではモザイクを示す「雪姫かぶ」で約 18%総 AsA 量が有意に増加したものの、他の 2 品種では増加は認められなかった。一方、予想に反して高度抵抗性を示すハクサイ 2 品種（「秋まさり」及び「空海 65」）において総 AsA 蓄積量が 50～60%増加することが見出された（Figure 5）。この 50%程度の総 AsA 蓄積量の増加がどの程度抗ウイルス性に寄与しているのかを調べるため、次に、アラビドプシスの変異体による実験を行った。アスコルビン酸酸化酵素 AO 遺伝子

における T-DNA 挿入変異によって総 AsA 蓄積量が野生型に対して訳 33%増加した変異体（Yamamoto et al. 2005）を用いてそのウイルス耐性を野生型と比較したところ、変異体でウイルスの蓄積が抑えられていることが示された（Figure 6）。また、氷川（2012）の報告でもカブ品種において AsA 含量とウイルス耐性の間に有意な相関が認められているが、AsA が高含量でウイルスに耐性の品種と AsA が低含量でウイルスに対して感受性の品種を比べると、AsA 含量の差は 50%程度であった。従って、*Rnt1-1* による高度抵抗性に連動して生じる総 AsA 蓄積量の 50～60%の増加は抗ウイルス性を示すのに十分であると考えられた。このように AsA は植物体内に蓄積されている抗ウイルス化合物という点ではファイトアンチシピン、ウイルスの侵入に応答して蓄積量が増加するという点ではファイトアレキシンとして位置づけられると考えられた。

高度抵抗性は細胞レベルでウイルスの増殖を抑制する抵抗性であり（Kang et al. 2005）、ウイルスの侵入のかなり早い段階で誘導されると考えられる。一方、高度抵抗性と連動した総 AsA 蓄積量増加はウイルス接種後 3 日目から観察された（Figure 7）。おそらくこの時点ではすでに高度抵抗性は確立されており、総 AsA 蓄積量の増加は直接この抵抗性に寄与していない可能性がある。*N. tabacum* の TBSV に対する高度抵抗性では、SA とエチレンがシグナルとして働いている（Sansregret et al. 2013）。本研究では、高度抵抗性と連動した総 AsA の蓄積が JA を介した経路によって誘導されることを明らかにしたが、もし *Rnt1-1* による高度抵抗性においても SA とエチレンが関与しているなら、総 AsA の蓄積は高度抵抗性とは異なる経路で誘導されている可能性が出てくる。なぜなら、SA 経路と JA 経路の間にはクロストークが存在し互いに拮抗的に働くと考えられるため（Koornneef and Pieterse 2008）、JA による総 AsA の蓄積と SA による高度抵抗性が同時に誘導されるとは考えにくいからである。おそらく SA を介した高度抵抗性がまず誘導され、この抵抗性が確立した後にこれに影響を与えないタイミングで JA の蓄積誘導とこれに引き続く総 AsA の蓄積が誘導されるものと考えられる。このように総 AsA の

蓄積誘導は高度抵抗性自体に寄与する可能性は低いと考えられるものの、ウイルスに対する耐病性を増大させるのに十分な量が増加することから、むしろ局部獲得抵抗性として誘導されている可能性が考えられる。さらに全身獲得抵抗性として誘導されるのかどうか確かめるため非接種上位葉での総 AsA 蓄積の推移を調べたところ、有意ではないものの一過的に AsA 増加の傾向が認められた（data not shown）。しかし、これについては今後 AsA の酸化・リサイクル経路に関わる遺伝子の発現などさらに解析し明らかにする必要がある。

Figure 14 に本研究で明らかとなった *Rnt1-1* による高度抵抗性と連動した総 AsA 蓄積量増加の誘導経路を示す。第 3 章で明らかにされたように *Rnt1-1* と非病原性因子 CI タンパクとの間の相互作用によって高度抵抗性が誘導されるが、この高度抵抗性が確立した後に JA 類縁体が蓄積しこれらにより AsA の酸化抑制並びに酸化型 AsA である DHA の還元経路が活性化され AsA が蓄積する。これとは異なり、傷などの非生物的ストレスを受けた場合、発生する活性酸素種を消去するために AsA 合成経路上の遺伝子の発現が活性化されることが報告されているが（Suza et al. 2010）、AsA 合成経路上には多くの酵素が関わっており、そのため AsA の合成には少なくとも数時間かそれ以上の時間がかかると考えられる（Bartoli et al. 2006）。一方、AsA の酸化あるいはリサイクルに関わる反応はともに一反応であり、特に DHA が分解や他化合物へ転用されないように DHAR によって AsA に還元することによって迅速に AsA プールサイズを増加させることが可能だと思われる。局部獲得抵抗性のような防御反応においてもこの迅速な AsA プールサイズの増加が重要であり、そのため AsA の合成経路ではなく酸化・還元経路がターゲットされているのであろう。

植物における酵素的な AsA の酸化には細胞内で働く APX とアポプラストで働く AO が関与しているが（Conklin and Barth 2004; Yamamoto et al. 2005）、*Rnt1-1* 抵抗性に伴う総 AsA 含量の増加においては両方の発現が抑制されることによって AsA の酸化が抑え

られていると考えられた。しかし、MeJA 処理では APX の発現は抑制されるが AO の発現は逆に促進された（Figure 11b）。$H_2O_2$（Figure 11a）及び SA 処理（data not shown）においても AO 遺伝子の発現を抑制する作用は認められず、また ABA 処理では AO 遺伝子の発現が抑制傾向にあったものの（data not shown）、ウイルス接種後の ABA 蓄積量は低下していたことから（Figure 13）、高度抵抗性に連動した総 AsA の蓄積誘導における AO の制御にはそれら以外の因子が関わっており、その因子と JA 経路との間には複雑なクロストークが存在すると想定された（Figure 14）。AsA のリサイクル経路では DHA を還元する DHAR と MDHA を還元する MDHAR が働いている。*Rnt1-1* 抵抗性では DHAR の発現が大きく増加するが、MDHAR の発現はむしろ抑制される傾向にあった（Figure 8）。しかし、その抑制程度はわずかであり、AsA リサイクル経路の活性化に対する影響は小さいものと考えられた。

*Rnt1-1* による高度抵抗性に連動した総 AsA 蓄積量の増加では、AsA の合成経路ではなく酸化・還元経路の制御が重要であった。AsA の酸化が抑制され DHA の還元が促進されることから、AsA の増加とともに DHA の減少が予想された。実際、DHAR の過剰発現体を用いた研究の多くでは、DHAR の活性増加によって AsA 量、AsA/DHA 比ともに増加している例が多い（Chen et al. 2003; Qin et al. 2011; Wang et al. 2010）。しかし、本研究では UK1 接種後の「秋まさり」における AsA/DHA 比は Mock 処理の場合と大きな違いはなかった。DHA は植物体内において、AsA が酸化されて H 残基が 2 つ付加された構造だけでなく、pH や温度によってダイマーや、水和型の構造をとり常に遷移していると報告されている（Wechtersbach et al. 2011）。本研究で、植物はウイルス感染という強く連続したストレス条件にさらされており、その代謝状態は不安定であったと考えられる。よって、DHA の構造が安定した状態になかったため、それぞれの分子形態について正確な定量が困難だったのではないだろうか。よって、*Rnt1-1* 抵抗性で観察される AO、APX の発現抑制や DHAR の発現促進では総 AsA の増加は起きても AsA/DHA

比の有意な増加は観察されないのかもしれない。

TuMV-UK1 に対し *Rnt1-1* による高度抵抗性を示す「秋まさり」において、UK1 接種後の植物ホルモンの蓄積量を見ると、JA は接種後 6 時間と 48 時間でウイルス接種区のほうが Mock 区よりも蓄積量が低くなった（Figure 13）。特に接種後 48 時間における減少程度は大きかった。一方、JA 類縁体である JA-Ile 及び JA に由来する TA, TAG の蓄積量は Mock 区に比べてウイルス接種区で期間を通じ高く推移する傾向にあった（Figure13）。特に、JA-Ile は接種後 24 時間、TAG では JA が減少する接種後 48 時間において顕著に増加した。TAG は TA の配糖体であり、TA は JA を前駆物質として合成されることを考えると（Wakuta et al. 2010）、接種 48 時間で JA の合成量が減少しているのは矛盾するように見える。しかし、JA-Ile や TAG は JA があって初めて合成されることから（Wakuta et al. 2010）、おそらく接種後 24 時間から 48 時間の間に JA が一過的に増加し、増加した JA が速やかに JA-Ile や TA, TAG に変換されるのではないかと考えられた。また、JA-Ile がシグナルとして機能する活性体であるということ（Staswick and Tiryaki 2004）、TA がバレイショ塊茎形成のシグナル物質として機能していること（Yoshihara et al. 1989）、さらに TA 及び TAG が傷害や病原体による攻撃などのストレスに応答するシグナル物質として機能している可能性が示唆されていること（Seto et al. 2009）を考えると JA よりはむしろ JA に由来するこれらの物質が *Rnt1-1* 抵抗性における総 AsA 蓄積誘導においてシグナルとして機能している可能性がある。これらの JA 類縁体のうちどの物質が重要なのか、それらは相乗的に働くのかなど、今後さらに研究を進めて明らかにする必要がある。

本研究では、*B. rapa* 作物において TuMV に対する高度抵抗性が発現すると、それに伴い局部獲得抵抗性の一つとして抗ウイルス作用をもつ AsA の蓄積が誘導されること及びこの AsA 蓄積には JA 類縁体がシグナルとして介在し、主に AsA の酸化経路の抑制とリサイクル経路の促進によって AsA 蓄積量が増加することを明らかにした。ウイ

ルスに対する高度抵抗性は細胞死を伴わない抵抗性であるが、そのメカニズムについては不明な点が多く、獲得抵抗性が誘導されるという報告もない。過敏感細胞死（HR）を伴う抵抗性では、HR が生じるとその周辺の非感染部位に SA 及び JA, エチレンを介した局部獲得抵抗性が誘導され、さらに全身の非感染組織に SA を介した全身獲得抵抗性が誘導される（Tsuyumu et al. 2005）。本研究では、HR で観察される局部獲得抵抗性と同様に高度抵抗性においても JA 経路を介した接種葉での抵抗反応が誘導されることを初めて報告した。また、本研究から、植物が生物ストレスに応答して AsA 含量を増加させる場合にそれがどのような経路を制御して行われるのか、関与する誘導シグナルも含めて初めて明らかにされた。上述したように、迅速な防御応答が必要な場面では植物はもっとも効率的な方法を選択し抗ウイルス性をもった AsA の蓄積誘導を行っているものと考えられる。

内生 AsA の 50%程度の増加で *B. rapa* 植物の TuMV に対する耐性は有意に増加すると考えられた。そのため、比較的低濃度の AsA 処理によっても *B. rapa* 植物を TuMV に対して抵抗的にできる可能性がある。次章では、外から投与する AsA が TuMV に対する抗ウイルス剤としてどの程度有効かその検証を行った。

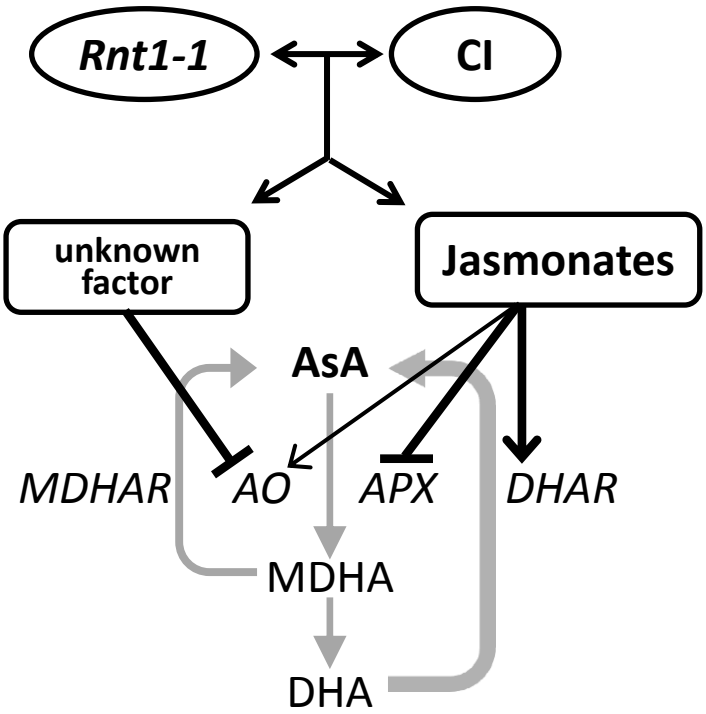



**Figure 14** A model of induction pathway for ascorbic acid (AsA) accumulation observed in the plants carrying the extreme resistance gene Rnt1-1 after inoculation of the Turnip mosaic virus strain UK1.

The interaction between Rnt1-1 and the cylindrical inclusion (CI) protein of UK1 activates the jasmonate (JA)-mediated signaling pathway resulting in enhancement and suppression of expression of dehydroascorbate reductase (DHAR) gene and ascorbate peroxidase (APX) gene, respectively. Expression of ascorbate oxidase (AO) gene is suppressed by an unknown factor that antagonistically acts to JAs. Up-regulation of DHAR and down-regulation of APX and AO lead to increment of AsA level. MDHA: monodehydroascorbate, DHA: dehydroascorbate.

## 第 5 章　*Brassica rapa* 作物における TuMV に対するアスコルビン酸の抗ウイルス剤としての効果

### 背景及び目的

宿主のウイルス防御機構である RNA サイレンシングに対してウイルスは RNA サイレンシングサプレッサー（RSS）を産生し、この RSS は RNA サイレンシング機構に重要な DCL や AGO タンパクあるいは siRNA と結合することで RNA サイレンシングを阻害する（Peláez and Sanchez 2013a）。一方、植物の細胞内に比較的多量に含まれているアスコルビン酸（AsA）には、この RSS と siRNA との結合を阻害する作用のあることが Shimura et al.（2008）による *in vitro* の実験から明らかにされた。さらに、本研究の第 4 章では、実際に植物が細胞内で産生する AsA に抗ウイルス作用があり、*B. rapa* 植物が TuMV の侵入を受けた際、防御反応の一つとして AsA 蓄積の誘導が起こることも明らかにした。これらの事実は、AsA が有効な抗ウイルス剤である可能性を示唆している。これまで効果の高い抗ウイルス剤はほとんど開発されていないため、本章では実用化を念頭に、化学的により安定な AsA 各種誘導体の抗ウイルス効果について *B. rapa* と TuMV の系を用いて検討した。

また、AsA が間接的な RNA サイレンシング活性化物質として *in vivo* でも働いているかどうか明らかにする目的で、ここではより高い抗ウイルス性を示した AsA の酸化型である DHA を用い、この DHA が RNA サイレンシングの働かない *Arabidopsis* の *dcl2*/*dcl4* 二重変異体において抗ウイルス作用を示すかどうかを調べた。DCL2 及び DCL4 はウイルスの 2 本鎖 RNA を切断し RNA サイレンシングに必要な siRNA を生ずるタイプ III のリボヌクレアーゼで（Peláez and Sanchez 2013b）、この両酵素がない *Arabidopsis* の *dcl2*/*dcl4* 二重変異体では TuMV に対して RNA サイレンシングがほとんど働かない

（Garcia-Ruiz et al. 2010）。もし DHA が RNA サイレンシングを間接的に活性化する働きをもつのであれば、逆に RNA サイレンシングをあらかじめ不活性化した植物では DHA もウイルスに対して効果を示さないはずである。この点を明らかにすることで、AsA に RNA サイレンシング活性化作用があることを改めて示した。

## 材料と方法

### 1. 材料

#### (1) 供試ウイルス

Turnip mosaic virus（TuMV）のダイコン系統（TuR1）に黄色蛍光タンパク質（YFP）をつなぎ、ウイルスの複製とともに YFP が生産される形質転換ウイルス（TuMV-TuR1-YFP）を用いた。接種源はカブ品種「雪姫かぶ」で継代したものを用いた。また、圃場の罹病植物から分離した TuMV-C2 を用いた。この接種源はハクサイ品種「優春」で継代したものを用いた。接種源とした植物はいずれもグロースチャンバー（温度 21℃、12 時間日長）で育成した。

#### (2) 供試植物

カブ品種「早生大蕪」及び「耐病ひかり」を用いた。また、*A. thaliana* 野生型 Columbia（Col-0）及び *dcl2/dcl4* 二重変異体（CS66078）を用いた。変異体は Arabidopsis Biological Resource Center より購入した。

#### (3) 供試化合物

水溶性 AsA 誘導体である 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及び酸化型アスコルビン酸は、いずれも濃度 20 mM とし 0.2%（v/v）Tween 20 を添加した。脂溶性 AsA 誘導体である L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル（AsA-Pal）は展着剤が添加されたマイクロエマルジョン化されたものを用い、AsA-Pal が 1 mM となるように懸濁して用いた。

2. 方法

(1) 植物個体の養成

植物は MLR-350 グロースチャンバー（SANYO）で 21°C、12 時間日長、150 μmol/m/s で育成した。

(2) ウイルスの接種

ハクサイ及びカブは播種後約 1 週間の展開した子葉に、*A. thaliana* は播種後約 4 週間のよく展開したロゼッタ葉に汁液接種を行った。接種は第 3 章の方法と同様に行った。

(3) AsA 誘導体の処理

半葉法においては、綿棒を用いて葉の片側にのみ塗布した。植物体または葉全体に処理する場合はスプレーにより処理した。

(4) ELISA

ELISA は第 4 章と同様の方法で行った。

## 結果

### アスコルビン酸の抗ウイルス効果解析法の確立

まず、ウイルス感染に対する投与 AsA の効果を評価するための解析法の確立を行った。ウイルス感染への葉組織の感受性は、AsA を処理した葉でも処理していない葉でも同一でなければならないことから、解析法として半葉処理を用いた。まずウイルスをカブ品種「早生大蕪」の葉全体に接種し、AsA を綿棒で葉の片側半分にのみ塗布した。TuMV-TuR1 に感染した「早生大蕪」はモザイクを示すが、接種葉での感染点の数を視覚化するため、感染部位において YFP を生産する TuMV 感染性クローン（TuMV-TuR1-YFP）を用いた。AsA は水中で容易に酸化され、また、DHA は不安定な化合物であることが知られていたため、安定な 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-$SO_4$）及び脂溶性のアスコルビン酸パルミチン酸エステル（AsA-Pal）を選んだ。AsA-Pal を処理した葉の右側では感染点は無処理の左側と比べて有意にその数が減っていた（Figure 15, 16a）。また、AsA-$SO_4$ や AsA-Pal による薬害は観察されなかった。これらの結果から、以降の解析法としてこの半葉処理を用いることとした。

次に、AsA 誘導体の抗ウイルス効果を検出するのに最適なウイルス接種法と AsA 誘導体処理の間隔について検討した。ウイルス接種 1 時間後及び 6 時間後に AsA 誘導体を処理し、3 日後に蛍光観察により感染点数を測定した。感染点数は接種 1 時間後処理で AsA-$SO_4$ 処理で 45%、AsA-Pal 処理で 32%減少した（Figure 16a）。また、AsA-$SO_4$ 及び AsA-Pal とも、接種 6 時間後処理よりも接種 1 時間後処理のほうが効果が大きかった（Figure 16a）。これらの結果から、AsA 処理は接種した時点からの処理が早ければ早いほど効果的であることが示唆された。

AsA 誘導体の複数回処理による効果を調べるために、まず AsA-Pal を接種 1 時間後に

植物体全体に噴霧し、その後 24 時間ごとに合計 6 回噴霧した。これは、噴霧した AsA が細胞内で徐々に酸化・分解し、その効果が継時的に減少すると考えたからである。複数回処理の後、接種葉におけるウイルス蓄積量を ELISA により測定した。AsA-Pal の複数回処理による葉への薬害は無く、ウイルス蓄積量は有意に 38%減少した（Figure 16b）。

**アスコルビン酸誘導体及び酸化型アスコルビン酸の抗ウイルス効果**

酸化型アスコルビン酸（DHA）はヘルペスウイルス、インフルエンザウイルス及びポリオウイルスなどの動物ウイルスに対して強い抗ウイルス剤として働くことから（Furuya et al. 2008）、AsA 誘導体（AsA-$SO_4$ 及び AsA-Pal）と DHA の抗ウイルス効果を比較することとした。カブ品種「早生大蕪」において 20 mM DHA 処理によって TuMV-TuR1-YFP 感染点数が 80%減少し、このとき薬害は見られなかった（Figure 17）。品種ごとの DHA 及び TuMV への感受性の違いを避けるため、また、TuMV 自然分離系統への DHA の抗ウイルス効果を見るため、カブ品種「耐病ひかり」と TuMV-C2 という品種・ウイルス組合せ（えそ斑点を生じる）を用いて同様の実験を行った。20 mM DHA 処理によって感染点数が 65%減少し、さらに、DHA の複数回処理によってウイルス蓄積量が ELISA 値で約 40%減少した（Figure 18）。これらの結果から、DHA は動物で報告された（Furuya et al. 2008）ように、植物においても抗ウイルス剤として機能することが示された。

これまでの結果及び Shimura et al.（2008）の報告から、AsA 誘導体が抗ウイルス剤として機能するメカニズムは、葉の表面から吸収された後、細胞内で RSS 阻害剤として機能することによるものであると予想された。そこで、AsA 誘導体や DHA が直接 TuMV ウイルス粒子に作用している可能性を除くため、次の 2 つの実験を行った。AsA 誘導体及び DHA を TuMV 接種源磨砕液に混ぜて接種試験を行った。それぞれの最終濃度は AsA-$SO_4$ は 2 mM、AsA-Pal は 0.1 mM、DHA は 2 mM とした。これらの濃度は噴霧処理

に用いた濃度よりも低いが、細胞内の AsA 濃度のレベルを考慮して設定した。接種試験の結果、「早生大蕪」の葉における感染点数に AsA 誘導体及び DHA は影響を示さなかった（Figure19）。この結果から、AsA 誘導体及び DHA は TuMV ウイルス粒子に直接作用してウイルス粒子を破壊しているのではないということが示された。

次に、「早生大蕪」の本葉第 1 及び第 2 葉に TuMV を接種し、1 時間後に葉柄から切り取り、切り取った葉柄の先端を 20 mM AsA-$SO_4$ 溶液に浸す「葉挿し法」を行った。「葉挿し法」では AsA 誘導体は直接細胞内に取り込まれるため、細胞内での AsA の効果をより明確に観察できると考えた。水に浸したコントロールと比べて、感染点数は 70% 減少し（Figure 20a）、さらに、感染点サイズの抑制も観察された（Figure 20b）。

***Arabidopsis* の *dcl2/dcl4* 二重変異体における DHA の抗ウイルス効果**

AsA 誘導体や DHA がウイルス RSS 阻害剤として機能することが示唆されたことから、DHA が実際に植物のサイレンシング機構で機能していることを明らかにするため、サイレンシング機能を欠損させた植物での DHA の効果を解析した。DCL2 及び DCL4 は *A. thaliana* に感染した TuMV を分解するためのサイレンシング機構において重要なダイサーとして機能している（Garcia-Ruiz et al. 2010）ことから、*A. thaliana dcl2/dcl4* 二重変異体を用いることとした。結果は、野生型の Col-0 では、無処理区と比較して DHA 処理によってウイルス蓄積レベルが減少したが、*dcl2/dcl4* 変異体では DHA 処理の効果は得られなかった（Figure 21a）。この結果では統計的な有意差を示すことはできなかったが、Figure 3 及び 4 で示したカブ品種とは異なり、*A. thaliana* は葉が小さく接種が困難であり、また、個体ごとにウイルスへの感受性が異なるためであると考えられる。一方、全身移行の遅速についてはよりはっきりとした結果を得た。野生型 Col-0 では、DHA 処理により TuMV の全身移行が遅れたのに対し、*dcl2/dcl4* 変異体では mock 処理区と DHA 処理区との間で全身移行のタイミングに差がなかった（Figure 21b）。しかし本実

験では、予想に反して *dcl2/dcl4* 変異体に TuMV を接種した時には、ウイルスの全身移行が野生型の Col-0 に比べて必ずしも促進されなかった。すなわち、見かけ上、*dcl2/dcl4* 変異によってウイルスに対する感受性が高くなったような観察結果にはならなかった。この原因は不明だが、過去に Garcia-Ruiz et al.（2010）の論文でも同様の現象が報告されている。ただし、少なくとも Col-0 より抵抗的になってウイルスの移行が抑制されることはなかった。したがって、*dcl2/dcl4* 変異体において DHA の効果が観察されなかった原因は、*dcl2/dcl4* 変異によるサイレンシング機構の破壊のためだと思われ、AsA とサイレンシングの 関係を強く示唆するものである。

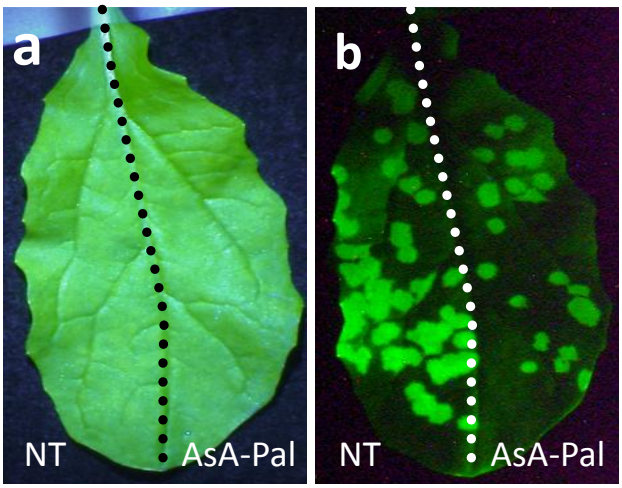



**Figure 15** Assay system using half-leaf treatments to observe the effect of ascorbic acid (AsA)-derivatives (e.g. AsA-Pal) on *Turnip mosaic virus* (TuMV) in *Brassica rapa* cv. Wase-ohkabu.

Plants were grown for 14 days at 21°C with a 12-h photoperiod. The second true leaf was mechanically inoculated with TuMV-TuR1-expressing the yellow fluorescent protein (TuMV-TuR1-YFP). a, AsA-Pal was applied only to the right side of the leaf 1 h later with the cotton swab. b, Viral infection sites are seen as YFP fluorescent spots 4 days post-inoculation. NT: nontreated.

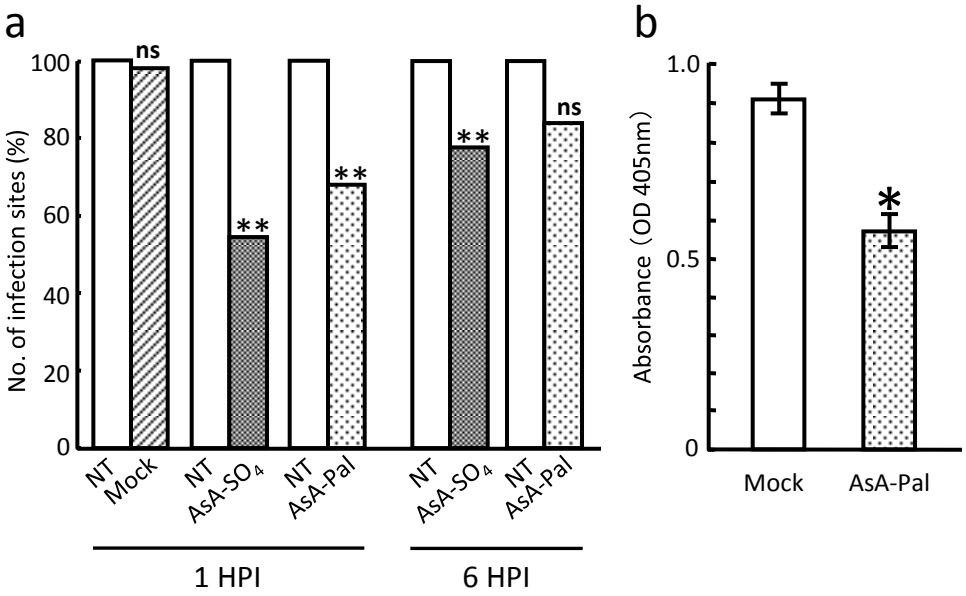



**Figure 16** Effect of ascorbic-acid (AsA) derivatives on *Turnip mosaic virus* (TuMV) infection in turnip plants.

a, Number of infection sites on inoculated leaves of *Brassica rapa* cv. Wase-ohkabu at 3 days postinoculation (DPI) when treated with AsA derivatives at 1 h or 6 h postinoculation (HPI) with TuMV-TuR1-expressing the yellow fluorescent protein (TuMV-TuR1-YFP). Plants were grown and treated as described for Figure 15. Mock treatment was done with water containing 0.2% (v/v) Tween20. Data are from at least eight replicates. Statistical significance was evaluated with Student's *t* test for paired sample; **P < 0.01 and ns: no significant difference. NT: nontreated. b, Effect of regular AsA-Pal treatment on viral accumulation in inoculated leaves of *B. rapa* cv. Wase-ohkabu. Plants were prepared as described for Figure 15. AsA-Pal was sprayed on the entire plant 1 HPI with TuMV-TuR1-YFP, then every 24 h for a total of six sprays. The enzyme-linked immunosorbent assay was carried out at 8 DPI. Data are from six replicates. Error bars indicate standard errors. Statistical significance was evaluated with Student's *t*-test for independent samples; *P < 0.05.

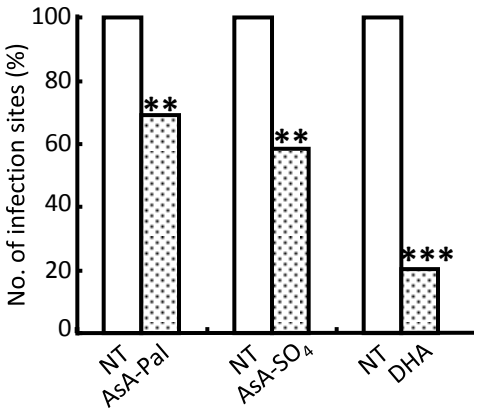



**Figure 17** Comparison of antiviral effect of the ascorbic acid (AsA) derivatives and dehydroascorbic acid in *Brassica rapa* cv. Wase-ohkabu after inoculation with Turnip mosaic virus-TuR1-expressing the yellow fluorescent protein.

Experiment was done as in Figure 16. Data are from at least eight replicates. Statistical significance was evaluated with Student's *t* test for paired samples; ** $P < 0.01$, ***$P < 0.001$ and ns: no significant difference. NT: non-treated.

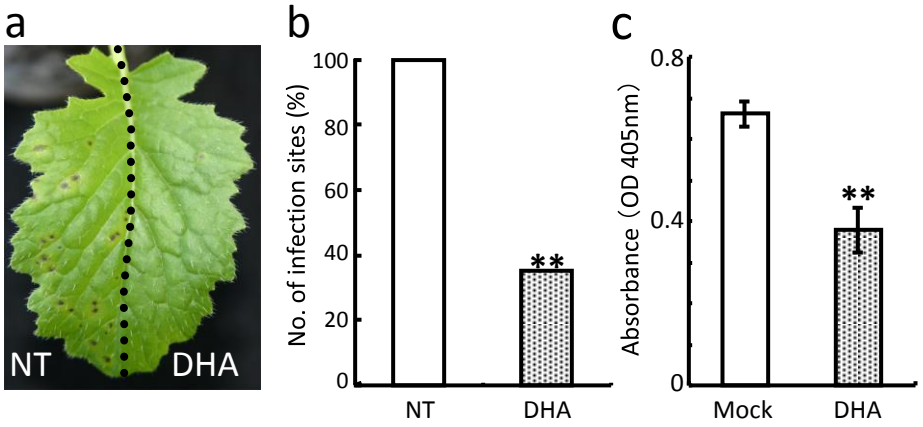



**Figure 18** Effect of treatment with 20 mM dehydroascorbic acid (DHA) on number of virus infection sites and virus accumulation in leaves of *Brassica rapa* cv. Taibyo-hikari inoculated by a Turnip mosaic virus (TuMV) strain C2.

Plants were grown as described for Fig. 15. a, Treated, inoculated leaf at 3 days postinoculation (DPI). b, Number of infection sites after nontreatment or DHA treatment at 3 DPI. c, Viral accumulation in inoculated leaves after control or regular DHA treatment at 7 DPI as measured in an ELISA with absorbance at 405 nm. DHA was sprayed on the entire plant 1 h postinoculation with TuMV-C2, then every 24 h for a total of six sprays. Data are from at least six replicates. Error bars indicate standard errors. Statistical significance was evaluated with the paired sample *t*-test (b) or the independent samples *t*-test (c); **P < 0.01. NT: non-treated.

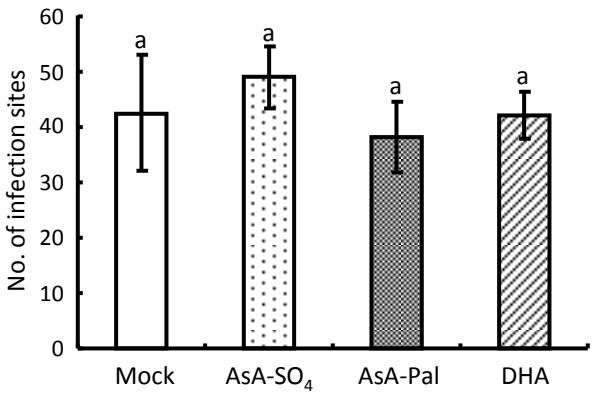



**Figure 19** Inoculation tests of *Brassica rapa* cv. Wase-ohkabu using sap containing the ascorbic acid (AsA) derivatives and dehydroascorbic acid (DHA).

The Turnip mosaic virus-TuR1-expressing the yellow fluorescent protein (TuMV-TuR1-YFP)-infected leaf was ground in 10 volumes of 0.1 M phosphate buffer and AsA-$SO_4$, AsA-Pal or DHA were added to the sap for final concentrations of 2, 0.1 and 2 mM, respectively. Viral infection sites were observed as YFP fluorescent spots 4 days postinoculation. Data are from six replicates. Means followed by the same letter did not differ significantly (Tukey's test at P = 0.05). Error bars indicate standard errors.

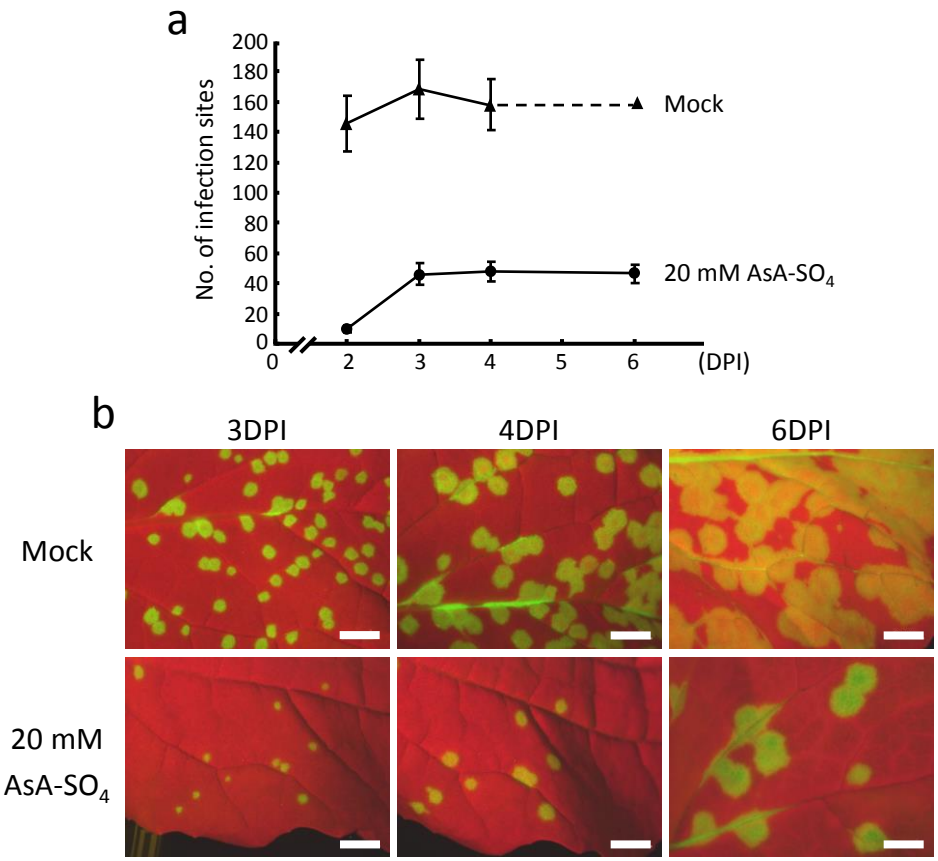



**Figure 20** Effect of an ascorbic acid (AsA) derivative, AsA-$SO_4$ on Turnip mosaic virus (TuMV) in detached leaf assay.

First and second true leaves of *Brassica rapa* cv. Wase-ohkabu were cut out from the basal part of petiole 1 h postinoculation, and the cut edge of the petiole was put into the Petri dish containing 20 mM AsA-$SO_4$. After 18 h, sample leaves were transferred to the Petri dish containing water and incubated at 21°C with a 12-h photoperiod for 6 days. a, Change in the number of infection sites on the leaves infected by TuMV-TuR1-expressing the yellow fluorescent protein (TuMV-TuR1-YFP). Data for the 20 mM AsA-$SO_4$ treatment at 6 days postinoculation (DPI) were judged to be equal to that at 4 DPI because infection spots had merged and could not be differentiated from each other. b, Fluorescent stereomicrographs of second true leaves at various times after inoculated with TuMV-TuR1-YFP . Scale bar is 3 mm.

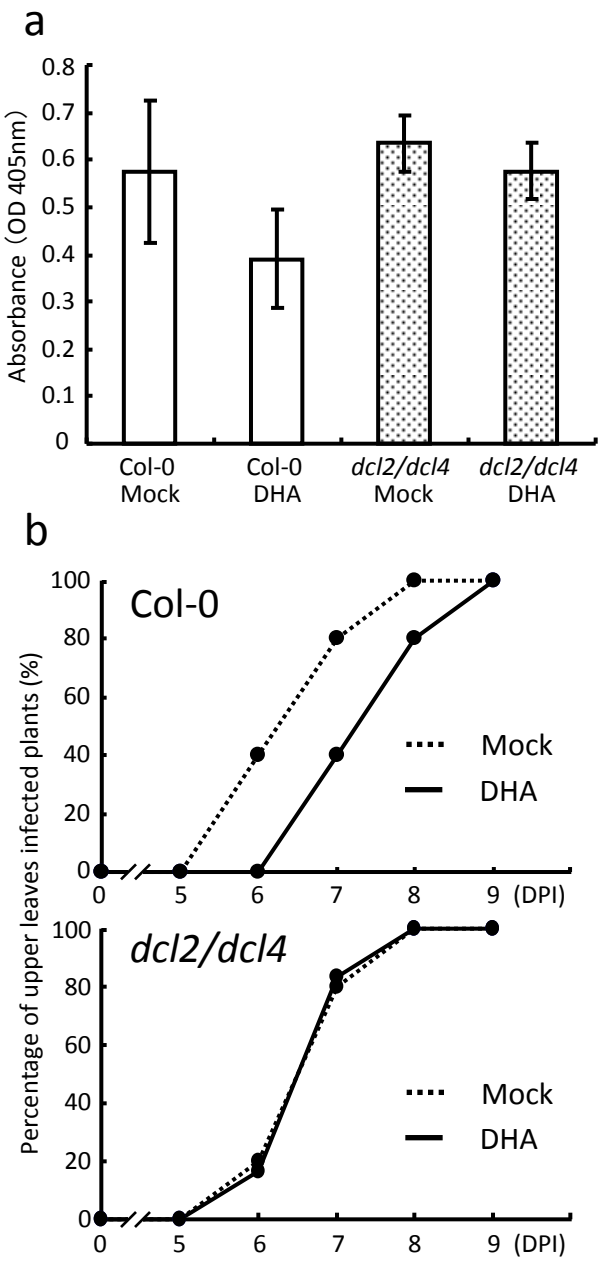



**Figure 21** Effect of dehydroascorbic acid (DHA) on viral accumulation in *Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0 and the *dcl2/dcl4* mutant.

Plants were grown for 30 days at 21ºC with a 12-h photoperiod. Three rosette leaves were mechanically inoculated with Turnip mosaic virus-TuR1-expressing the yellow fluorescent protein (TuMV-TuR1-YFP). DHA was sprayed on the entire plant 1 h postinoculation and then every 24 h for a total of six sprays. a, Viral accumulation levels in inoculated leaves were measured at 7 days postinoculation using an ELISA. Data are from three replicates. Error bars indicate standard error. b, Systemic infection of *dcl2/dcl4* mutant by TuMV-TuR1-YFP after DHA treatment. Upper, noninoculated leaves were monitored for YFP fluorescence for 10 days after viral inoculation. Five to six plants were used for each test. Similar results were obtained twice.

## 考察

AsA 及び DHA の作用機構について、Furuya et al.（2008）はフリーラジカルの形成や、ウイルスへの直接的な結合が動物ウイルスに対する AsA や DHA の抗ウイルス効果として機能しているのではないかと仮説を立てていた。しかし、著者が所属する研究室における過去の研究結果から、アスコルビン酸アニオンやアスコルビン酸ラジカルなどの負に帯電した AsA 類が、正に帯電した RSS などのウイルスタンパク質に結合するものと考えている。現段階では、AsA の抗酸化作用が関与するかどうかについては定かではない。実際、AsA 類による抗酸化作用と抗ウイルス性の関与について報告はなく、他の要因が AsA による抗ウイルス作用に関与することが示唆されている（Furuya et al. 2008）。

本研究の結果及び過去の報告から、AsA 誘導体や DHA は RSS の阻害物質として働いているものと予想している。TuMV への抗ウイルス効果が最も高かったのが DHA であった。これは、DHA が持つヘミケタール構造が最も適していたということを示唆している。一方、ヒトでは AsA よりも DHA のほうがグルコーストランスポーターを介して細胞内に取り込まれやすく（Vera et al. 1995）、取り込まれた DHA は AsA に還元され、細胞内で抗酸化物質として機能する。もし同様のことが植物でも起こっているとすれば、還元された DHA（つまり AsA）が細胞内で抗酸化物質として機能していることになる。実際、DHA は植物体内で DHAR によって還元される（Chen et al. 2003）。DHA のヘミケタール構造形成によるアスコルビン酸アニオンの不均衡化は、細胞内での AsA 濃度の上昇において重要であると考えられており（DiLabio and Wright 2000）、これらのことから、AsA と比較して DHA のほうが強い抗ウイルス効果を示したのは、少なくとも細胞内への取り込まれやすさも影響しているものと考えられた。

本章では AsA 誘導体、特に DHA が強い抗ウイルス効果を示すことを明らかにし、*B. rapa* と TuMV の系において AsA が抗ウイルス剤として利用できる可能性を見出した。

また、半葉法や噴霧による葉表面からの処理方法よりも、葉柄から直接植物体内へ吸収させる葉挿し法のほうがウイルス感染初期での増殖及び複製抑制効果が高かった（Figure 17, 18, 20）。このことから、植物組織内への AsA の浸透性を高めることで、より高い抗ウイルス効果を得られることが示唆された。

# 第 6 章　総合考察

本研究では、アブラナ科作物における TuMV 感染によるえそ病徴の誘導機作を明らかにする目的で、*B. rapa* の TuMV に対する抵抗性遺伝子及びえそ病徴誘導遺伝子の同定並びにそれらの遺伝子の遺伝的な関係について解析を行った（第 3 章）。その結果、ハクサイ品種「秋まさり」がもつ TuMV-UK1 に対する高度抵抗性遺伝子（*Rnt1-1*）と「優春」のえそ誘導遺伝子（*rnt1-2*）は対立遺伝子であることが示唆された。また、ウイルス側の CI 遺伝子の変異によって *Rnt1-1* による抵抗性が打破される場合も表現型がえそ病徴に変わることが示された。これらの結果は、宿主の抵抗性遺伝子座における遺伝子型とウイルス側の非病原性遺伝子における遺伝子型の組み合わせによって、宿主側において抵抗性反応を誘導する場合もあれば、見かけ上罹病性反応と捉えられるえそを誘導する場合もあるということを意味している。ここで誘導されるえそは、おそらくタバコやアラビドプシスなどで報告されている HR 様のえそ反応であり（Kim et al. 2008）、本質的には抵抗性反応と変わらないと思われる。従って、逆説的ではあるが、ウイルス感染によるえそ病徴の発現を未然に防ぐにはウイルスとの組み合わせによりえそを誘導する可能性のある抵抗性遺伝子をあらかじめ育種的に取り除くことが必要になる。本研究では *Rnt1* 座に密接に連鎖する DNA 多型マーカーとして 129-center を見い出しており、このマーカーを選抜に用いることでえその要因となる *Rnt1-1* や *rnt1-2* を効率的に除くことが可能になろう。しかし、これだけではえその発症を防げてもウイルス感染による他の被害の根本的な解決方法にはならないため、ウイルス耐性の向上に向けた別の取り組みが必要である。TuMV に対する耐性遺伝子の報告は少ないが、本研究で内生 AsA が TuMV 耐性に寄与していることを初めて示した（第 4 章）。実際、氷川（2012）はカブ品種間で AsA 蓄積量と TuMV 耐性の間に正の相関関係があることを見出しており、AsA 含量に関する成分育種が直接 TuMV 耐性育種につながる可能性が高い。今後

の TuMV 育種は、抵抗性が崩壊した場合のリスクが大きい *Rnt1-1* などの major gene の導入ではなく、AsA 含量に関わる量的形質遺伝子座（QTL）の集積などが一つの方向性として考えられる。

*Rnt1* 遺伝子座は、第 6 染色体上の scaffold000129 配列内に設計した indel PCR マーカー129-center と共分離したことから、*Rnt1* 座はこのマーカーのごく近傍に連鎖していると考えられた。最近 *B. rapa* Genome Sequencing Project によりハクサイ品種「Chiifu-401-42」のゲノム情報（283.3 Mb）が明らかにされたが（Wang et al. 2011b）、この情報と本研究結果を合わせて考えてみると *Rnt1* が scaffold000129 配列内の約 300 kb の領域内に座乗していると推定された。本研究では *Rnt1* の同定までには至っていないが、この約 300 kb の領域内には CC-NB-LRR の構造を持つ 3 つの R 遺伝子様配列（Bra037448、Bra037451 及び Bra037453）がクラスターを形成しており、これらのいずれかが目的の遺伝子である可能性が高いと考えられる。

ハクサイ、カブでは品種により TuMV を接種した葉において AsA 蓄積量が増加する現象が観察された。特に *Rnt1-1* による高度抵抗性を示すハクサイ品種「秋まさり」および「空海 65」では AsA 含量がともに 1.5 倍程度に増加した。この AsA 蓄積量の増加は *Rnt1-1* による高度抵抗性と関連があると考えられたことから、本研究ではその誘導メカニズムの解析を行った（第 4 章）。その結果、AsA 蓄積量の増加は JA シグナルを介して AsA の酸化抑制及び酸化型 AsA（DHA）の還元促進が起きることによるものであることが明らかとなった。接種葉における AsA 蓄積量の増加は接種 3 日後から観察され、1 細胞レベルで迅速に誘導されていると考えられる高度抵抗性とはタイムラグがある。このことから、AsA 蓄積量の増加は高度抵抗性の一因であるというよりも、さらなるウイルス感染に備えた獲得抵抗性の側面が強いのではないかと考えられる。

本研究で得られた「高度抵抗性が JA シグナル系発動に必須であるという観察結果」については、高度抵抗性を有する 2 つの異なる品種において同様の結果を得ていること

から、“この１品種のみに特異的な現象ではなかったか”という指摘を否定できる。では、なぜJAシグナル系に高度抵抗性が必須なのだろうか。一つの説明として、感染初期に増殖するウイルス濃度が高度抵抗性によって極めて低レベルに抑制されるためではなかろうか。ウイルス濃度が低い場合には、SAによる抵抗性はSAの過剰生産を抑制するために一過性となり、その後にJA系が立ち上がったとしても何ら不思議なことではない。一方、ウイルスが感受性品種に感染し、高濃度に増殖した場合には、SAによる基礎抵抗性が長期間維持され､JA系はSAの拮抗によって発動しないと考えることにも矛盾がない。微生物が植物に病気を誘導しないレベルで感染し、低濃度で植物体に蓄積する、いわゆる共生の場合には、植物でJA系が主に発動されていることが判明しており（後述する)、これと同様の現象ととらえると理解できることである。

高度抵抗性の誘導にJAシグナルが関与しているという報告はこれまでにないが、JAシグナルを介した抵抗性反応については多くの報告がある。Necrotrophicな病原菌や食害昆虫による攻撃あるいは物理的な傷に対する防御反応の誘導にJAが関わっている他（Pieterse et al. 2009)、根圏において共生微生物の感染を受けた場合に誘導されるinduced systemic resistance（ISR）のシグナルとしてもJAは働く（Pieterse et al. 2009)。このうち吸汁昆虫による食害や傷はウイルスの侵入を媒介するものであり、ウイルス感染の可能性を高めるものである。こうしたストレスに対してJAを介した抵抗性が誘導される場合、同じJAシグナル経路によってウイルスに対する防御としてのAsA蓄積も誘導されている可能性がある。さらに*N. glutinosa*及びワタ（*Gossypium hirsutum*）ではJA処理によりRNAサイレンシング機構で重要な働きをする*RDR6*の発現が上昇することが報告されている（Wang et al. 2012; Yang et al. 2011)。JAを介して*RDR6*発現上昇とAsA蓄積増加が同時に起こるとすれば、2つの側面からRNAサイレンシング機構を活性化させることが可能である。このようにウイルス防御という面から見てみると、ウイルスの媒介機会の減少、RNAサイレンシングの活性化、ウイルスサプレッサータンパ

クの阻害といった一連の抗ウイルス防御システムがJAシグナルを介して統御（とうぎょ）されているように見える。今後、これら抗ウイルス反応が相互にどのように関連して制御されているのか明らかにすることは、ウイルスに対する植物の基礎抵抗性を理解するとともにウイルス耐性育種の方法を考えていく上で重要であると思われる。

植物ウイルスに対する有効な農薬はこれまでほとんど無かったが、AsAは抗ウイルス剤として有望であることが本研究より示された（第5章）。本研究では*B. rapa*とTuMVの系においてAsAの抗ウイルス効果を検証したが、この効果はTuMVに限定されるものではない。AsAはウイルスのサプレッサータンパクとsiRNAの結合を阻害すると考えられているが、サプレッサータンパクがsiRNAと結合する場合その間の結合は静電気的なものであり、負に荷電しているAsAは正に荷電しているサプレッサータンパクのsiRNA結合部位に結合してその機能を阻害する。従って、同様なメカニズムによってRNAサイレンシングを抑制するサプレッサータンパクに対してAsAはすべて抗ウイルス効果を示すことが期待される。実際、本研究の結果が報告された後、DNAウイルスであるトマト黄化葉巻ウイルスに対してもAsAが有効であることが報告された（影山ら 2012）。また、ウイルスに留まらずAsAは抗菌性物質として糸状菌に対しても有効であることが報告されている。イネいもち病菌の場合では、AsA溶液中で正常な付着器の形成が阻害される（Egan et al. 2007）。アルタナリアの場合は、培地中に添加されたAsAによって正常な菌糸の進展が阻害された（Botanga et al. 2012）。糸状菌の場合、先端生長の誘導シグナルとして活性酸素種が重要な役割を果たしており、AsAによって活性酸素種が消去されることで正常な菌糸の進展などが阻害されるものと考えられる（Tudzynski et al. 2012）。一方、アルファルファに0.02% AsAをインフィルトレーションすると、茎でのalfalfa aphidやblue-green aphidなどアブラムシの生殖率が減少することが報告されている（Goggin et al. 2010）。このようにAsAの防御効果はウイルス、糸状菌、昆虫と広範囲に渡っており、汎用性農薬としての可能性をも秘めている。

AsA の農薬としての利用場面は圃場栽培だけではない。抗ウイルス剤としての利用を考えた場合、ウイルスフリー株育成のための茎頂培養における培地への添加剤としても有効である。アスパラガスのアスパラガスウイルスフリー株育成や、ニンニクのリークイエローストライプウイルス及びタマネギ萎縮ウイルスフリー株育成において、茎頂培養時に AsA を培地に処理することでウイルスフリー化率が高まることが報告されている（長谷部ら 2013; 松尾ら 2013）。この他にも、水耕栽培において培養液中に AsA を添加するなど様々な利用方法が考えられる。農薬としての AsA の問題点は、AsA が化学的に不安定な物質であり、水溶液中で容易に酸化・分解されてしまうことである。この問題は、AsA-$SO_4$ 及び AsA-Pal のようなより化学的に安定した誘導体を合成し用いることで解決できる。これらの誘導体は植物細胞内に取り込まれた後、分解されて AsA として働くと考えられる。また、L-ガラクトースのような AsA 合成の前駆物質を投与する方法もあるかもしれない。L-ガラクトースも AsA に比べると化学的に安定で、植物細胞に吸収された後 AsA に変換される。AsA 誘導体については共同研究を行っている農薬メーカーで農薬化が進められており、農薬としての AsA の有効性が圃場で実証されていくものと思われる。

本研究では、ハクサイの *Rnt1-1* 遺伝子による TuMV 抵抗性において AsA の蓄積が誘導されることを見出し、この AsA 蓄積がウイルスに対する防御反応として起きていることを明らかにした。さらにこの AsA を植物体に処理することによって TuMV 感染を防ぐことができることを示し、AsA の農薬化への端緒を開いた。これらの研究結果が基礎研究だけにとどまらず、応用技術として実際の農業に活用される知見、技術となることを期待したい。

## 引用文献


Anandalakshimi R, Pruss GJ, Ge X, Marathe R, Mailory AC, Smith TH, Vance VB (1998) A viral suppressor of gene silencing in plants. Proc Natl Acad Sci USA 95:13079-13084

Agius F, González-Lamothe R, Caballero LJ, Muñoz-Blanco J, Botella AM, Valpuesta V (2003) Emgineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of D-galacturonic acid reductase. Nat Biotechnol 21:177-181

Alvarez EM, Pennell IR, Meijer PJ, Ishikawa A, Dixon AR, Lamb C (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. Cell 92:773-784

Andino R, Böddeker N, Silvera D, Gamarnik AV (1999) Intracellular determinants of picornavirus replication. Trend Microbil 7:76-82

Bartoli CG, Yu J, Gómez F, Fernández L, Mclntosh L, Foyer CH (2006) Inter-relationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves. J Exp Bot 57:1621-1631

Bendahmane A, Kanyuka K, Baulcombe CD (1999) The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. Plant Cell 11:781-791

Botanga JC, Bethke G, Chen Z, Gallie RD, Fiehn O, Glazebrook J (2012) Metabolite profiling of *Arabidopsis* inoculated with *Alternaria brassicicola* reveals that ascorbate reduces disease severity. Mol Plant Microbe Interact 25:1628-1638

Brigneti G, Voinnet O, Li W-X, Ji L-H, Ding S-W, Boulcombe DC (1998) Viral pathogenicity determinants are suppressors of trasgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. EMBO J 17:6739-6746

Broekaert FW, Delauré LS, De Bolle FCM, Cammue PAB (2006) The role of ethylene in host-pathogen interactions. Annu Rev Phytopathol 44:393-416

Bruening G (2006) Resistance to Infection. In: Loebenstein G, Carr JP (eds) Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses. Springer, Dordrecht, pp 211-240

Burd CG, Dreyfuss G (1994) Conserved structures and diversity of function of RNA-binding proteins. Science 265:615-621

Chen S, Das P, Hari V (1994) In situ localization of ATPase activity in cells of plants infected by maize dwarf mosaic potyvirus. Arch Virol 134:433-439

Chen Z, Young ET, Ling J, Chang S, Gallie RD (2003) Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. Proc Natl Acad Sci USA 100:3525-3530

Conklin LP, Barth C (2004) Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogen, and the onset of senescence. Plant Cell Environ 27:959-970

Conklin LP, Gatzek S, Wheeler LG, Dowdle J, Raymond JM, Rolinski S, Isupov M, Littlechild AJ, Smirnoff N (2006) *Arabidopsis thaliana VTC4* encodes L-Galactose-1-P phosphatase, a plant ascorbic acid biosynthetic enzyme. J Biol Chem 281:15662-15670

Conklin LP, Pallanca EJ, Last LR, Smirnoff N (1997) L-ascorbic acid metabolism in the ascorbate-deficient Arabidopsis mutant *vtc1*. Plant Physiol 115:1277-1285

Cronin S, Verchot J, Haldeman-Cahill R, Schaad MC, Carrington JC (1995) Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. Plant Cell 7:549-559

Daros J-A, Schaad MC, Carrington JC (1999) Function analysis of the interaction between VPg-Proteinase (NIa) and RNA polymerase (NIb) of tobacco etch potyvirus, using conditional and suppressor mutants. J Virol 73:8732-8740

Derksen H, Rampitch C, Fouad D (2013) Signaling cross-talk in plant disease resistance. Plant Sci 207:79-87

DiLabio GA, Wright JS (2000) Hemiketal formation of dehydroascorbic acid drives ascorbyl radical anion disproportionation. Free Radic Biol Med 29:480–485

Dinesh-Kumar SP, Tham WH, Baker BJ (2000) Structure-function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*. Proc Natl Acad Sci USA 97:14789-14794

Ding SW (2010) RNA-based antiviral immunity. Nat Rev Immunol 10:632-644

Dolja VV, Haldeman R, Robertson NL, Dougherty WG, Carrington JC (1994) Distinct function of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. EMBO J 13:1482-1491

Egan JM, Wang ZY, Jones AM, Smirnoff N, Talbot JN (2007) Generation of reactive oxygen species by fungal NADPH oxidases is required for rice blast disease. Proc Natl Acad Sci USA 104:11772-11777

Fedorkin ON, Merits A, Lucchesi J, Solovyev AG, Saarma M, Morozov SY, Makinen K (2000) Complementation of the movement-deficient mutation in potato virus X; potyvirus coat protein mediates cell-to-cell trafficking of C-terminal truncation but not deletion mutant of potexvirus coat protein. Virology 270:31-42

Fellers J, Wan J, Hong Y, Collins GB, Hunt AG (1998) In vitro interactions between a potyvirus-encoded, genome-linked protein and RNA dependent RNA polymerase. J Gen Virol 79:2043-2049

Fernandez A, Lain S, Garcia JA (1995) RNA helicase activity of the plum pox potyvirus CI protein expressed in *Escherichia coli*. Mapping of RNA binding domain. Nucl Acids Res 23:1327-1332

Fobert RP, Després C (2005) Redox control of systemic acquired resistance. Curr Opin Plant Biol 8:378-382

Furuya A, Uozaki M, Yamasaki H, Arakawa T, Arita M, Koyama AH (2008) Antiviral effects of ascorbic and dehydroascorbic acids in vitro. Int J Mol Med 22:541–545

Gallie RD (2013a) L-ascorbic acid: a multifunctional molecule supporting plant growth and development. Scientifica http://www.hindawi.com/journals/scientifica/2013/795964/

Gallie RD (2013b) The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. J Exp Bot 64:433-443

Garcia-Ruiz H, Takeda A, Chapman EJ, Sullivan CM, Fahlgren N, Brempelis KJ, Carrington JC (2010) Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection. Plant Cell 22:481–496

Goggin LF, Avila AC, Lorence A (2010) Bioessays 32:777-790

Hajimorad MR, Ding XS, Flasinsli S, Mahajan S, Graff E, Haldeman-Cahill R, Carrington JC, Cassidy BG (1996) NIa and NIb of peanut stripe potyvirus are present in the nucleus of infected cells, but do not form inclusions. Virology 224:368-379

Haroldsen MV, Chi-Ham LC, Kulkarni S, Lorence A, Bennett BA (2011) Constitutively expressed DHAR and MDHAR influence fruit, but not foliar ascorbate levels in tomato. Plant Physiol Biochem 49:1244-1249

長谷部葉子, 吉田直人, 志村華子, 増田税 (2013) ニンニクの生長点培養時のアスコルビン酸処理がウイルス蓄積に及ぼす阻害効果. 平成 25 年度植物病理学会北海道部会（口頭発表）

氷川貴大 (2012)「アブラナ科植物におけるアスコルビン酸含量とウイルス耐性の関係」平成 24 年度卒業論文, 北海道大学生物資源科学科細胞工学研究室

Hong Y, Hunt AG (1996) RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. Virology 226:146-151

Hong Y, Levay K, Murphy JF, Klein PG, Shaw JG, Hunt AG (1995) A potyvirus polymerase interacts with the viral coat protein and VPg in the yeast cells. Virology 214:159-166

Hughes SL, Hunter PJ, Sharpe AG, Kearsey MJ, Lydiate DJ, Walsh JA (2003) Genetic mapping of the novel Turnip mosaic virus resistance gene TuRB03 in Brassica napus. Theor Appl Genet 107:1169-1173

Inukai T, Nelson RJ, Zeigler RS, Sarkarung S, Mackill DJ, Bonman JM, Takamure I, Kinoshita T (1994) Allelism of blast resistance genes in near-isogenic lines of rice. Phytopathology 84:1278-1283

Jenner CE, Sánchez F, Nettleship SB, Foster GD, Ponz F, Walsh JA (2000) The cylindrical inclusion gene of *Turnip mosaic virus* encodes a pathogenic determinant to the Brassica resistance gene *TuRB01*. Mol Plant Microbe Interact 13:1102-1108

Jenner CE, Tomiura K, Oshima K, Hughes SL, Walsh JA (2002) Mutation in *Turnip mosaic virus* P3 and cylindrical inclusion proteins are separately required to overcome two *Brassica napus* resistance genes. Virology 300:50-59

Jenner CE, Wang X, Tomimura K, Ohshima K, Ponz F, Walsh JA (2003) The dual role of the potyvirus P3 protein of *Turnip mosaic virus* as a symptom and avirulence determinant in brassicas. Mol Plant Microbe Interact 16:777-784

Jones DGJ, Dangl LJ (2006) The plant immune system. Nature 444:323-329

影山智津子, 伊代住浩幸, 万年潤哉, 高草伸生, 佐野愼亮 (2012) 新しい抗ウイルス剤を用いたトマト黄化葉巻病の発病抑制. 平成 24 年度植物病理学会大会（口頭発表）

Kanda A, Tsuda S (2008) Plant viral vaccine to protect plant from pepper mild mottle virus (in Japanese), Nogyo & Engei 83:967-975

Kaneko Y, Inukai T, Suehiro N, Natsuaki T, Masuta C (2004) Fine genetic mapping of the *TuNI* locus causing systemic veinal necrosis by *Turnip mosaic virus* infection in *Arabidopsis thaliana*. Theor Appl Genet 110:33-40

Kang B-C, Yeam I, Jahn MM (2005) Genetics of plant voris resistance. Annu Rev Phytopathol 43:581-621

Kasschua KD, Carrington JC (1998) Require for HC-Pro processing during genome amplification of tobacco etch potyvirus. Virology 209:268-273

Kim B, Masuta C, Matsuura H, Takahashi H, Inukai T (2008) Veinal necrosis induced by *Turnip mosaic virus* infection in *Arabidopsis* is a form of defense response accompanying HR-like cell death. Mol Plant Microbe Interact 21:260-268

Kim B, Suehiro N, Natsuaki T, Inukai T, Masuta C (2010) The P3 protein of *Turnip mosaic virus* can alone induce hypersensitive response-like cell death in *Arabidopsis thaliana* carrying *TuNI*. Mol Plant Microbe Interact 23:144-152

Kim D-H, Han JS, Lew J, Kim SS, Kang BH, Hwang DC, Jang DS, Kim W, Song BD, Choi KY (1998) Effects of mutations in the C-terminal region of NIa protease on *cis*-cleavage between NIa and NIb. Vilorogy 241:94-100

Klein PG, Klein RR, Rodriguez Cerezo E, Hunt AG, Shaw JG (1994) Mutation analysis of the tobacco vein mottling virus genome. Virology 204:759-769

Koornneef A, Pieterse CMJ (2008) Cross-talk in defense signaling. Plant Physiol 146:839-844

Lain S, Martin MT, Riechmann JL, Garcia JA (1991) Novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection: nucleic acid-stimulated ATPase activity of the plum pox potyvirus helicaselike protein. J Virol 65:1-6

Lain S, Riechmann JL, Garcia JA (1990) RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. Nucl Acids Res 18:7003-7006

Langenberg WG, Zhang L (1997) Immunocytrogy shows the presence of tobacco etch virus P3 protein in nuclear inclusion. J Struct Biol 118:243-247

Lazzarato L, Trebbi G, Pagnucco C, Franchin C, Torrigiani P, Betti L (2009) Exogenous spermidine, arsenic and beta-aminobutyric acid modulate tobacco resistance to tobacco mosaic virus, and affect local and systemic glucosylsalicylic acid levels and arginine decarboxylase gene expression in tobacco leaves. J Plant Physiol 166:90-100

Lecoq H, Moury B, Desbiez C, Palloix A, Pitrat M (2004) Drable virus resistance in plants through conventional approaches: a challenge. Virus Res 100:31-39

Li XH, Valdez P, Olvera RE, Carrington JC (1997) Function of the tobacco etch virus RNA polymerase (NIb): subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (NIa). J Virol 71:1598-1607

Linster LC, Clarke GS (2008) L-Ascorbate biosynthesis in higher plants: the role of VTC2. Trends Plant Sci 13:567-573

Loewus AF (1963) Tracer studies on ascorbic acid formation in plants. Phytochemistry 2:109-128

Mahajan S, Doljia VV, Carrington JC (1996) Roles of the sequence encoding tobacco etch virus capsid protein in genome amplification: requirements for the translation process and a cis-active element. J Virol 70:4370-4379

Maia IG, Haenni A-L, Bernardi F (1996) Potyvirus HC-Pro: a multifunctional protein. J Gen Virol 77:1335-1341

Martin MT, Garcia JA, Cervera MT, Goldbach RW, Van-Lent JWM (1992) Intracellular localization of three non-structural plum pox potyvirus proteins by immunogold labeling. Virus Res 25:201-211

松尾典之, 志村華子, 増田税, 鈴木卓 (2013) アスコルビン酸および凍結処理によるアスパラガス実生からのウイルス除去. 平成 25 年度植物病理学会北海道部会（口頭発表）

Matsuura H, Aoi A, Satou C, Nakaya M, Masuta C, Nabeta K (2009) Simultaneous UPLC MS/MS analysis of endogenous jasmonic acid, salicylic acid, and their related compounds. Plant Growth Regul 57:293-301

Merits A, Guo D, Saarma M (1998) VPg, coat protein and five non-structural proteins of potato A potyvirus bind RNA in a sequence-unspecific manner. J Gen Virol 79:3123-3127

Nagai K (1996) RNA-protein complex. Curr Opin Struct Biol. 6:53-61

Padgett SH, Beachy NR (1993) Analysis of a tobacco mosaic virus capable of overcoming *N* gene-mediated resistance. Plant Cell 5:577-586

Pavet V, Olmos E, Kiddle G, Mowla S, Kumar S, Antoniw J, Alvarez EM, Foyer HC (2005) Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in Arabidopsis. Plant Physiol 139:1291-1303

Peláez P, Sanchez F (2013a) Small RNAs in plant defense responses during viral and bacterial interactions: similarities and differences. Front Plant Sci, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3763480/

Peláez P, Sanchez F (2013b) Small RNA pathways and diversity in model legumes: lessons from genomics. Front Plant Sci, http://www.frontiersin.org/Journal/10.3389/fpls.2013.00236/abstract

Pieterse MJC, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees CMS (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. Nat Chem Bilo 5:308-316

Pirone TP, Blanc S (1996) Helper-dependent vector transmission of plant viruses. Annu Rev Phytopathol 34:227-247

Pruss G, Ge X, Shi XM, Carrington JC, Vance VB (1997) Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of geterologous viruses. Plant Cell 9:859-868

Qian W, Zhang S, Zhang S, Li F, Zhang H, Wu J, Wang X, Walsh AJ, Sun R (2013) Mapping and candidate-gene screening of the novel Turnip mosaic virus resistance gene *retr02* in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) Theor Appl Genet 126:179-188

Qin A, Shi Q, Yu X (2011) Ascorbic acid contents in transgenic potato plants overexpressing two dehydroascorbate reductase genes. Mol Bio Rep 38:1557-1566

Qu F, Ye X, Morris JT (2008) *Arabidopsis* DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. Proc Natl Acad Sci USA 105:14732-14737

Riechmann JL, Lain S, Garcia JA (1992) Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. J Gen Virol 76:951-956

Rodrifuez-Cerezo E, Ammar ED, Pirone TP, Shaw JG (1993) Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusion in potyvirus-infected cells. J Gen Virol 74:1945-1949

Rojas MR, Murillo Zerbini FM, Allison RF, Gillbertson RL, Lucas WJ (1997) Capsid protein and helper component-proteinase function as potuvirus cell-to-cell movement proteins. Virology 237:283-295

Rusholme RL (2000) The genetic control of resistance to turnip mosaic virus in *Brassca*. PhD thesis. University of East Anglia

Rusholme RL, Higgins EE, Walsh JA, Lydiate DJ (2007) Genetic control of broad-spectrum resistance to turnip mosaic virus in *Brassica rapa* (Chinese cabbage). J Gen Virol 88:3177-3186

Saenz P, Cervera MT, Dallot S, Quiot J-B, Reichmann JL, Garcia JA (2000) Identification of a pathogenicity determinant of Plum pox virus in the sequence encoding the C-terminal region of protein P3+6K1. J Gen Virol 81:557-566

Sandermann H jr. (2000) Active oxygen species as mediators of plant immunity: three case studies. Biol Chem 381:649-653

Sansregret R, Dufour V, Langlois M, Daayf F, Dunoyer P, Voinnet O, Bouarab K (2013) Extreme resistance as a host counter-counter defense against viral suppression of RNA silencing. PLos Pathog 9:e1003435

Sayama H (2003) Control of cucumber mosaic virus (CMV) in tomato by attenuated CMV strain, Nogyogijutsu 58:307-311

Schaad MC, Jensen PE, Carrington JC (1997) Formation of plant RNA virus replication complex on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. EMBO J 16:4049-4059

Seto Y, Hamada S, Matsuura H, Matsushige M, Satou C, Takahashi K, Masuta C, Ito H, Matsui H, Nabeta K (2009) Purification and cDNA cloning of a wound inducible glucosyltransferase active toward 12-hydroxy jasmonic acid. Phytochemistry 70:370-379

Shimura H, Fukagawa T, Meguro A, Yamada H, Oh-hira M, Sano S, Masuta C (2008) A strategy for screening an inhibitor of viral silencing suppressors, which attenuates symptom development of plant viruses. FEBS Lett 582:4047–4052

Staswick PE, Tiryaki I (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Aravidopsis. Plant Cell 16:2117-2127

Suza ZP, Avila CA, Carruthers K, Kulkarni S, Goggin LF, Lorence A (2010) Exploring the impact of wounding and jasmonates on ascorbate metabolism. Plant Phyisol Biochem 48:337-350

Takahashi H, Suzuki M, Natsuaki K, Shigyo T, Hino K, Teraoka T, Hosokawa D, Ehara Y (2001) Mapping the virus and host genes involved in the resistance response in cucumber mosaic virus-infected *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol 42:340-347

Takeda A, Iwasaki S, Watanabe T, Utsumi M, Watanabe Y (2008) The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among *Argonaute* proteins. Plant Cell Physiol 449:493-500

Tamura A (1999) Effect of low temperature on the sugar and ascorbic acid contents of Komatsuna (*Brassica campestris* L.) under limited solar radiation (in Japanese). J Japan Soc Hort Sci 68:409-413

Tamura M (1984) Chinese cabbage. In: the alumni association of Plant virus institute (eds) Disease in vegetables. Yo-kendo, Tokyo, pp196-204 (in Japanese)

土崎常男, 栃原比呂志, 亀谷満郎, 柳瀬春夫 (1993) 原色 作物ウイルス病事典. 全国農村教育教会. Pp338-360

Tsuda K, Kosaka Y, Kobori T, Shiomi H, Musumi K, Kataoka M (2005) Effect of fertilizer application on yield and vitamin C content of tomato inoculated with the attenuated isolate CM95 of cucumber mosaic virus (in Japanese with English abstract). Jpn J Phytopathol 71:1-5

Tsuyumu S, Leach EJ, Shiraishi T, wolpert T (2005) Genomic and genetic analysis of plant parasitism and defense. The American Phytopathological Society, St. Paul, pp249-257

Tudzynski P, heller J, Siegmund U (2012) Reactive oxygen species generation in fungal swdevelopment and pathogenesis. Curr Opin Microbiol 15:653-659

Uchibori A, Sasaki J, Takeuchi T, Kamiya M, Tazawa A, Inukai T, Masuta C (2009) QTL analysis for resistance to *Soybean dwarf virus* in Indonesian soybean cultivar Wilis. Mol Breeding 23:323-328

Van der Does D, Leon-Reyes A, Koornneef A, Van Verk CM, Rodenburg N, Pauwels L, Goossens A, Körbe PA, Memelink J, Ritsema T, Van Wees CMS, Pieterse MJC (2013) Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of $SCF^{COI1}$-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcriptional factor ORA59. Plant Cell 25:744-761

Vance VB, Berger PH, Carrington JC, Hunt AG, Shi XM (1995) 5' Proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. Virology 206:583-590

Vera JC, Rivas CI, Vela´squez FV, Zhang RH, Concha II, Golde DW (1995) Resolution of the facilitated transport of dehydroascorbic acid from its intracellular accumulation as ascorbic acid. J Biol Chem 270:23706–23712

Verchot J, Carrington JC (1995a) Debilitation of plant potyvirus infectivity by P1 prioteinase-inactivating mutations and restoration by second-site modifications. J. Virol. 69:1582-1590

Verchot J, Carrington JC (1995b) Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in *trans* as an accessory factor for genome amplification. J. Virol. 69:3668-3674

Wakuta S, Hamada S, Ito H, Matsuura H, Nabeta K, Mtsui H (2010) Identification of a *β*-glucosidase hydrolyzing tuberonic acid glucoside in rice (*Oryza sativa* L.). Phytochemistry 71:1280-1288

Walsh JA, Jenner CE (2002) *Turnip mosaic virus* and the quest for durable resistance. Mol Plant Pathol 3:289-300

Walsh JA, Jenner CE (2006) Resistance to *Turnip mosaic virus* in the *Brassicaceae*. In: Loebenstein G, Carr JP (eds) Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses. Springer, Dordrecht, pp 415-430

Walsh JA, Rusholme RL, Hughes SL, Jenner CE, Bambridge JM, Lydiate DJ, Green SK (2002) Different classes of resistance to turnip mosaic virus in *Brassica rapa*. Eur J Plant Pathol 108:15-20

Walsh JA, Sharpe AG, Jenner CE, Lydiate DJ (1999) Characterization of resistance to turnip mosaic virus in oilseed rape (*Brassica napus*) and genetic mapping of *TuRB01*. Theor Appl Genet 99:1149-1154

Wang M, Li S, Yang H, Gao Z, Wu C, Guo X (2012) Characterization and functional analysis of *GhRDR6*, a novel *RDR6* gene from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Biocsci Rep 32:139-151

Wang RY, Powell G, Hardie J, Pirone TP (1998) Role of the helper component in vector-specific transmission of potyviruses. J Gen Virol 79:1519-1524

Wang X, Ullah Z, Grumet R (2000) Interaction between zucchini yellow mosaic potyvirus RNA-dependent RNA polymerase and host poly-(A) binding protein. Virology 275:433-443

Wang X, Wang H, Wang J, Sun R, Wu J, Liu S, Bai Y, Mun J-H, Bnacroft I, Cheng F, Huang S, Li X, Hua W, Wang J, Wang X, Freeling M, Pires CJ, Paterson HA, Chalhoub B, Wang B, Hayward A, Sharpe GA, Park B-S, Weisshaar B, Liu B, Li B, Liu B, Tong C, Song C, Duran C, Peng C, Geng C, Koh C, Lin C, Edwards D, Mu D, Shen D, Soumpourou E, Li F, Fraser F, Conant G, Lassalle G, King JG, Bonnema G, Tang H, Wang H, Belcram H, Zhou H, Hirakawa H, Abe H, Guo H, Wang H, Jin H, Parkin API, Batley J, Kim J-S, Just J, Li J, Xu J, Deng J, Kim AJ, Li J, Yu J, Meng J, Wang J, Min J, Poulain J, Wang J, Hatakeyama K, Wu K, Wang L, Fang L, Trick M, Links GM, Zhao M, Jin M, Ramchiary N, Drou N, Berkman JP, Cai Q, Huang Q, Li R, Tabata S, Cheng S, Zhang S, Zhang S, Huang S, Sato S, Sun S, Kwon S-J, Choi S-R, Lee T-H, Fan W, Zhao X, Tan X, Xu X, Wang Y, Qiu Y, Yin Y, LiY, Du Y, Liao Y, Lim Y, Narusaka Y, Wang Y, Wang Z, Li Z, Wang Z, Xiong Z, Zhang Z (2011b) The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. Nat Genet 43:1035-1039

Wang XB, Jovel J, Udompon P, Wang Y, Wu Q, Li WX, Gasciolli V, Vaucheret H, Ding SW (2011a) The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative argonautes in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell 23:1625-1638

Wang Z, Xiao Y, Chen W, Tang K, Zhang L (2010) Increased vitamin C content accompanied by an stress tolerance in *Arabidopsis*. J Integr Plant Biol 52:400-409

Wechtersbach L, Polak T, Ulrih PN, Cigić B (2011) Stability and transformation of products formed from dimeric dehydroascorbic acid at low pH. Food Chem 129:965-973

Wen HR, Khatabi B, Ashifield T, Saghai Maroof AM, Hajimorad RM (2013) The HC-Pro and P3 cistrons of an avirulent soybean mosaic virus are recognized by different resistance genes at the complex *Rsv1* locus. Mol Plant Microbe Interact 26:203-215

Wheeler LG, Jones AM, Smirnoff N (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. Nature 393:365-369

Whitham S, Dinesh-Kumar PS, Choi D, Hehl R, Corr C, Baker B (1994) The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to Toll and the Interleukin-1 receptor. Cell 78:1101-1115

Wolucka AB, Goossens A, Inzé D (2005) Methyl jasmonate stimulates the *de novo*biosynthesis of vitamin C in plant cell suspensions. J Exp Bot 56:2527-2538

Yamamoto A, Bhuiyan HMN, Waditee R, Tanaka Y, Esaka M, Oba K, Jagendorf TA, Takabe T (2005) Suppressed expression of the apoplastic ascorbate oxidase gene increses salt tolerance in tobacco and *Arabidopsis* plants. J Exp Bot 56:1785-1796

Yang H, Wang M, Gao Z, Zhu C, Guo X (2011) Isolation of a novel RNA-dependent RNA polymerase 6 from *Nicotiana glutinosa*, *NgRDR6*, and analysis of its response to biotic and abiotic stresses. Mol Biol Rep 38:929-937

Yin L, Wang S, Eltayeb EA, Uddin IM, Yamamoto Y, Tsuji W, Takeuchi Y, Tanaka K (2010) Overexpression of dehydroascorbate reductase, but not monodehydroascorbate reductase, confers tolerance to aluminum stress in transgenic tobacco. Planta 231:609-621

Yoshihara T, Omer EA, Koshino H, Sakamura S, Kikuta Y, Koda Y (1989) Structure of tuber-inducing stimulus from potato leaves (*Solanum tuberosum* L.). Agric Biol Chem 53:2835-2837

Zechmann B (2011) Subcellular distribution of ascorbate in plants. Plant Signal Behav 6:3, 360-363

Zhu S, Kolb FL, Kaeppler HF (2003) Molecular mapping of genomic regions underlying barley yellow dwarf tolerance in cultivated oat (*Avena sativa* L.). Theor Appl Genet 106:1300-1306

## 摘要

### 第 3 章　*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

・ハクサイ品種「秋まさり」、「優春」、「はやひかり」及びカブ品種「早生大蕪」に TuMV-UK1 系統を接種すると、「秋まさり」は高度抵抗性、「優春」は全身えそ、「はやひかり」はわずかなえそと退緑、「早生大蕪」はモザイク病徴を示した。

・「秋まさり」の抵抗性を打破する UK1 変異系統（UK1m）をその他の 3 品種に接種すると、いずれもマイルドなモザイクに病徴が変化した。よって、TuMV の感染により現れる病徴のタイプは、品種とウイルス系統の組合せにより決定されると考えられた。

・「秋まさり」「優春」及び「はやひかり」の自殖第 1 集団への UK1 接種試験の結果から、「秋まさり」は UK1 に対する単一の優性抵抗性遺伝子をヘテロ型で有し、「優春」はえそ誘導遺伝子をホモ型で有し、「はやひかり」は単一の劣性えそ誘導遺伝子をヘテロ型で有することが明らかとなった。

・「秋まさり」の抵抗性遺伝子と「優春」のえそ誘導遺伝子の対立性を調べるため、2 品種を交雑し、$F_1$ 集団に UK1 を接種すると、抵抗性と感受性が理論比 1:1 に分離した。

・$F_1$ 世代で抵抗性を示した個体から $F_2$ 世代として 12 集団を得た。これらに UK1 を接種したところ、6 集団で“抵抗性”と“えそ”が 3:1 に分離し、残りの 6 集団で“えそ”と“モザイクまたはマイルドなえそ”が 1:3 に分離した。よって、「優春」のえそ誘導

遺伝子が不完全劣性遺伝子であり、「秋まさり」の抵抗性遺伝子と「優春」のえそ誘導遺伝子は同座か密接に連鎖していることが示された。

・「秋まさり」の抵抗性遺伝子と「優春」のえそ誘導遺伝子を *Rnt1*（Resistance and necrosis to TuMV）遺伝子座の複対立遺伝子とし、抵抗性遺伝子を *Rnt1-1*、えそ誘導遺伝子を *rnt1-2*、えそを示さず感受性となる遺伝子を *rnt1-3* とした。

・*Rnt1* 遺伝子座の fine mapping の結果、第 6 染色体上の scaffold000129 内に作成した indel PCR マーカー129-center と組換え価 0%でごく近傍に連鎖していることが明らかとなった。

・「秋まさり」の抵抗性を打破し、「優春」「はやひかり」「早生大蕪」の病徴を変化させる UK1m の配列解析の結果、P3, CI 及び CP における変異はアミノ酸の変化を伴う非同義置換であった。これらの非同義置換を 1 箇所ずつ導入した感染性クローンを作成し、上記のハクサイ及びカブ 4 品種に接種したところ、CI における変異（V1827E）を導入したクローン（UK1-CIm）で UK1m と同様の反応・病徴を示した。よって、TuMV-UK1 の病徴決定因子は CI であることが明らかとなった。

## 第 4 章　*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

・ハクサイ、カブにおける TuMV 感染による AsA 蓄積量の変化を調べると、*Rnt1-1* による高度抵抗性を示す品種「秋まさり」及び「空海 65」において有意にそれぞれ 50%及び 62%増加し、高度抵抗性の組合せにおいて AsA 蓄積量が最も増加した。

・AsA 蓄積量が野生型よりも 33%増加した *ao* 変異体に TuMV-TuR1-YFP を接種したとき、ウイルス蓄積量が ELISA 値で 20%減少し、ウイルス耐性が有意に増大した。

・「秋まさり」に UK1 及び UK1m2（UK1 に由来する突然変異系統で、「秋まさり」に病原性）を接種し継時的に総 AsA 量を測定したところ、*Rnt1-1* による抵抗性誘導時に、接種後 3 日目から AsA 蓄積量が有意に約 40%増加することが明らかとなった。

・AsA 合成、酸化及びリサイクル経路に関与する酵素のうち、遺伝子の配列が明らかになっているものを用いて酵素遺伝子の発現量の解析を行った結果、合成経路上で増加する傾向の酵素遺伝子は認められなかった。一方、酸化経路上の APX4 及び tAPX 遺伝子の発現量が減少し、リサイクル経路上の DHAR1 遺伝子の発現量が増加することが明らかとなった。

・酸化及びリサイクル経路の酵素活性を測定すると、APX 及び AO の活性はウイルス接種後 5 日目に減少し、DHAR はウイルス接種後 5 日目に増加し、MDHAR はわずかに減少する傾向にあった。

・抵抗性誘導シグナルとして知られる過酸化水素、SA、JA（MeJA）及び ABA 処理による AsA 蓄積量の変化を調べると、過酸化水素処理では AsA 蓄積量が増加、SA 処理では変化は認められず、MeJA 処理では AsA 蓄積量が増加、ABA 処理では AsA 蓄積量が減少した。

・遺伝子発現解析の結果、過酸化水素処理では AOa の発現上昇や MDHAR の発現低下が認められた。一方、MeJA 処理では APX3a、APX3b 及び APX4 の発現量が有意に減少するとともに、DHAR1 の発現が有意に増加していることが見いだされ、これは *Rnt1-1* による抵抗性誘導時と同様のパターンであった。

・酵素活性の測定で、MeJA 処理で APX の活性が有意に 10%減少、DHAR の活性が有意に 9%上昇し、*Rnt1-1* 抵抗性誘導時と類似したパターンとなったことから、抵抗性と連動した AsA 蓄積量の増加においてシグナル物質として JA が関与することが示唆された。一方、MeJA 処理において抵抗性誘導時には観察されなかった AO の活性上昇も観察され、JA 以外の未知の因子も働いていることが示唆された。

・*Rnt1-1* による抵抗性誘導時の植物ホルモン蓄積量の推移を調べると、Mock 区に比べてウイルス接種区で JA-Ile は接種後 24 時間で約 1.8 倍、TA は接種後 24 時間で 2.7 倍、TAG は接種後 48 時間で約 3.6 倍に変化した。

・*Rnt1-1* による高度抵抗性と連動した総 AsA 蓄積量の増加が JA を介した経路によって誘導されることを明らかにした。

## 第 5 章　*Brassica rapa* 作物における TuMV に対するアスコルビン酸の抗ウイルス剤としての効果

・投与 AsA の効果を評価するための解析法として、葉全体にウイルスを接種し、その半分にのみ AsA を綿棒で塗布し、そしてウイルス感染点数による比較を行うという「半葉法」を確立した。

・投与 AsA として、安定な AsA 誘導体である水溶性の AsA-$SO_4$ 及び脂溶性の AsA-Pal をそれぞれ 20 mM 及び 1 mM で投与すると、薬害は観察されず、抗ウイルス性を示した。

・ウイルス接種 6 時間後よりも 1 時間後に AsA 誘導体を処理したほうが抗ウイルス効果が大きかったことから、AsA 処理は接種した時点から早ければ早いほど効果的であることが示唆された。

・AsA-Pal 複数回処理でも葉への薬害はなく、ウイルス蓄積量は有意に 38%減少した。

・動物で抗ウイルス効果が報告されていた DHA を投与すると、カブ品種「早生大蕪」に接種した TuMV-TuR1-YFP の感染点数が 80%減少し、カブ品種「耐病ひかり」に自然分離系統 TuMV-C2 を接種（えそ斑点を生じる）した場合にも感染点数が 65%減少したことから、DHA は植物においても抗ウイルス剤として機能することが示された。

・AsA 誘導体及び DHA を接種源磨砕液に混ぜて接種試験を行っても、感染点数に影響はなく、AsA 誘導体及び DHA は TuMV ウイルス粒子に直接作用して破壊しているので

はないということが示された。

・ウイルス接種 1 時間後に接種葉を葉柄から切り取り、切り取った先端を 20 mM AsA-$SO_4$溶液に浸す「葉挿し法」により、感染点数は 70%減少し、感染点サイズも抑制され、直接細胞内に取り込ませた場合に高い効果を示すことが示された。

・TuMV を分解するためのサイレンシング機構において重要な DCL2 及び DCL4 を欠損させた *dcl2/dcl4* 二重変異体と野生型の *A. thaliana* を用いて、TuMV 接種時の無処理と DHA 投与での TuMV 全身移行への効果を比較すると、野生型では mock 区に対して DHA 処理区で TuMV の全身移行が遅れたのに対し、変異体では mock 区も DHA 処理区も全身移行のタイミングには差が無く、DHA による抗ウイルス性がサイレンシング機構に関与することが強く示唆された。

## 謝辞

本研究において終始適切な御指導を賜りました細胞工学研究室の犬飼剛講師にこの場を借りて心より感謝申し上げます。また、常に御指導・御助言下さり、本論文を御校閲下さいました細胞工学研究室の増田税教授に心より感謝申し上げます。適切な御助言をくださった植物有用物質生産学研究室の松村健客員教授、園芸学研究室の志村華子助教に深く感謝申し上げます。本研究を行うにあたり、多大なるお力添えを頂きました細胞工学研究室の金澤章准教授、生物有機化学研究室の松浦英幸准教授には大変感謝しております。セミナーや研究発表会を通して御助言下さった植物病原学研究室の上田一郎教授、中原健二講師にも感謝いたします。長い研究生活を支えてくださった細胞工学研究室、植物病理学研究室、植物遺伝資源学研究室の皆様、御卒業なさった諸先輩方、支えてくれた友人たちに感謝しております。中でも、研究において御協力くださった十川聡子氏、氷川貴大氏、御助言下さった末田香恵博士に感謝申し上げます。最後に、博士課程への進学を認め、この 3 年間応援してくれた両親に心から感謝します。