

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 桂馬 拓也

植物ウイルスには効果的な化学薬剤が存在しないため、抵抗性品種はウイルスの重要な防除手段である。様々な作物においてウイルス抵抗性品種が育種されているが、そのうち約半数の抵抗性遺伝子座は劣性であると考えられている。しかし、植物ウイルスに対する劣性抵抗性遺伝子の知見は極めて限られている。

既報の劣性抵抗性遺伝子の多くは、翻訳開始因子 eukaryotic translation initiation factor (eIF) 4E、及びそのアイソフォームである eIFiso4E をコードする。これらの因子は mRNA のキャップ構造に結合し、翻訳反応の開始に寄与する。植物には、eIF4E、eIFiso4E に加え、さらなるアイソフォームとして novel cap binding protein (nCBP) が存在する。しかしながら、nCBP の欠損や変異によるウイルス感染阻害は報告されておらず、nCBP が eIF4E や eIFiso4E と同様にウイルスに対する劣性抵抗性遺伝子として働くかは不明であった。本研究では、nCBP の変異体植物で *Alphaflexivirus* 科および *Betaflexivirus* 科の様々な植物ウイルスの感染が阻害されることを明らかにした。さらに、plantago asiatica mosaic virus (PIAMV; *Alphaflexivirus* 科 *Potexvirus* 属) を用いて、ウイルス感染時に nCBP が果たす機能を明らかにした。

1. *Alphaflexivirus* 科および *Betaflexivirus* 科ウイルスに対する劣性抵抗性遺伝子 nCBP の同定

eIF4E アイソフォームをコードする遺伝子(eIF4E、eIFiso4E、nCBP) のそれぞれを欠損したシロイヌナズナ変異体に GFP 発現 PIAMV (PIAMV-GFP) を機械接種し、感染に伴う GFP 蛍光斑を観察した。その結果、ncbp 変異体において蛍光斑の大きさが顕著に低下した。定量 RT-PCR 解析により *ncbp* 変異体の接種葉におけるウイルス RNA の蓄積量は、野生型植物と比較して有意に減少していることを明らかにした。更に、*ncbp* 変異体の上位葉における PIAMV の検出頻度も低下し、検出された場合にも PIAMV 蓄積量は野生型植物に比べて有意に減少していた。*ncbp* 変異体に nCBP 遺伝子を形質転換した相補系統においては、接種葉におけるウイルスの蓄積量、および上位葉におけるウイルスの検出頻度は野生型植物と同程度に回復した。これらの結果から、nCBP の変異体植物では PIAMV の感染が阻害され、その全身感染が遅延することが示された。

nCBP の欠損が PIAMV 以外の植物ウイルスの感染に影響するか解析するため、さまざまな植物ウイルスを *ncbp* 変異体、相補系統、野生型植物に接種し、接種葉におけるウイルス蓄積量を定量した。その結果、*Alphaflexivirus* 科 *Potexvirus* 属の *Alternanthera mosaic virus* および *Cymbidium mosaic virus*、*Alphaflexivirus* 科 *Lolavirus* 属の *Lolium latent virus*、*Betaflexivirus* 科 *Carlavirus* 属の *Potato virus M* の蓄積量が、*ncbp* 変異体において野生型植物に比べて減少し、相補系統では回復した。従って、nCBP の欠損によって、

Alphaflexivirus 科および *Betaflexivirus* 科の植物ウイルスの感染が阻害されることが明らかとなった。一方で、*Potyvirus* 科 *Potyvirus* 属の *Turnip mosaic virus* や、*Virgavirus* 科 *Tobamovirus* 属の *Youcai mosaic virus* の蓄積量は、*ncbp* 変異体においても野生型植物と同等であった。

2. nCBP の欠損による *Potexvirus* 属ウイルスの感染阻害機構の解析

Potexvirus 属ウイルスの感染時に nCBP が果たす役割を明らかにするため、ウイルスの細胞間移行を観察した。パーティクルボンバードメント法により PIAMV-GFP を *ncbp* 変異体および野生型植物に接種し、ウイルスの広がりを経時的に観察した。その結果、ウイルスの細胞間移行に伴い拡大する蛍光斑の面積は *ncbp* 変異体で有意に減少し、細胞間移行が阻害されていることが示された。次いで、単細胞における PIAMV の増殖が阻害されているかを解析した。*ncbp* 変異体および野生型植物から調整したプロトプラストに PIAMV を接種し、プロトプラスト内でのウイルス蓄積量を定量 RT-PCR 法およびノーザンブロット法により評価したところ、*ncbp* 変異体においてゲノム RNA は野生型植物と同等に蓄積していた。従って、*ncbp* 変異体において細胞間移行の段階が阻害されていることが示された。

nCBP の欠損によってウイルスの細胞間移行が阻害されたことから、細胞間移行に関わるウイルスタンパク質の蓄積量を、*ncbp* 変異体と野生型植物の間で比較した。*ncbp* 変異体および野生型植物に PIAMV-GFP をアグロインフィルトレーション法によって接種し、接種葉から抽出した全タンパク質を用いたウェスタンブロッティングを行い、PIAMV ゲノムにコードされる 5 つのタンパク質を検出した。その結果、移行タンパク質 triple gene block protein (TGB) 2 および TGB3 の蓄積量が、*ncbp* 変異体において有意に低下していた。その他の 3 つのタンパク質は、*ncbp* 変異体と野生型植物間で同等に蓄積していた。以上より nCBP は植物細胞内での TGB2、TGB3 の蓄積に特異的に関与すると考えられた。TGB2、TGB3 は *Potexvirus* 属ウイルスが細胞間移行するうえで必須なタンパク質であることから、*ncbp* 変異体では TGB2、TGB3 の蓄積量が低下したことで、PIAMV の細胞間移行が阻害されたと考えられた。

本研究により、*Alphaflexivirus* 科および *Betaflexivirus* 科ウイルスの感染に nCBP が関与することが明らかとなった。植物ウイルスの感染に nCBP が重要であることを明らかにした初めての知見であり、また本発見により *eIF4E* 遺伝子の全てのアイソフォームがウイルスに対する劣性抵抗性遺伝子として働きうるということが初めて明らかになった。さらに本研究では、nCBP の変異体で *Potexvirus* 属ウイルスの細胞間移行が阻害されるメカニズムを明らかにした。これらの知見はウイルスの感染機構を理解するうえでも学術的価値が高く、劣性抵抗性遺伝子を利用したウイルス耐性植物の開発にも寄与する農学的に重要な研究成果である。以上より、審査委員一同は本論文が博士（農学）に値するものと認めた。