会 長 講 演

ポティウイルスの研究から見た植物ウイルス学[†]

上田 一郎*

UYEDA, I. *: What can we learn from basic plant virology?

1980年代から1990年にかけて、植物ウイルス学の基礎研究の成果は、植物ウイルス病の病理学における概念や技術の発展に大きく貢献してきた。こうした基礎研究が、クロロバ葉脈黄化ウイルス (CIYVV) に関する我々の研究に、どのような貢献をしたかにつ

いて述べる。CIYVV はおもに豆科作物に感染し、インゲン、ソラマメ、エンドウの多くの品種に激しいえそ病徴を起こす。CIYVV はポティウイルス属のウイルスで、そのゲノムはおよそ 9,500 塩基の (+) 一本鎖 RNA である。

昔も今も国内産インゲンの9割以上が北海道で生産されており、そのウイルス病の防除は、1970年代の北海道大学植物ウイルス病学・菌学講座の研究テーマの一つであった。すなわち、北海道でどんなウイルスがどれくらい発生しているかを調べると同時に、防除法を開発することであった。当時のインゲンのウイルス汚染調査から明らかになったことは、種子伝染性のインゲンモザイクウイルスの被害が大きいことと、大福品種に蔓枯れを起こす病害が大きな問題であることであった。CIYVV は、北海道ではこの蔓枯れ病を起こすウイルスとしてはじめに分離された。しかし、CIYVV は当時インゲン黄斑モザイクウイルス (BYMV) のえそ系統とされていた (Uyeda *et al.*, 1975)。CIYVV は、当時既に海外で記載があったが、BYMV と CIYVV の類縁関係は不明であった。このころは、また新しいウイルスがどんどん記載されている時代であり、ウイルスの合理的な分類体系の確立が強く望まれていた。当時のポティウイルスの種間の類縁関係を混乱させていたのは、抗血清の反応が類縁関係の解析に用いられていたことも大きな要因である。すなわち、CIYVV と BYMV が別種のウイルスとするには抗血清の交叉反応が強かったのである。また分類に対する考えも系統発生学を持ち込まない

としていたことが、さらにどう分類するかを困難にしていた。そんな中で、Shukula and Ward (1988) は、外被タンパクのアミノ酸配列の相同性を基準に、ポティウイルスの種と系統の分類を行うことを提唱した。すなわち、二つの別種のウイルス間では相同性が 80% 以下で、同じウイルス種の別の系統間では 90% 以上であった。早速、CIYVV と BYMV の外被タンパクのアミノ酸相同性を比べると 70 から 77% だったので、別のウイルスと結論し (Uyeda, 1992)、つる枯れ病の原因ウイルスは CIYVV と結論された。

1982年に、タバコモザイクウイルスゲノム RNA の全塩基配列が決定された (Goelet *et al.*, 1982)。これ以降、RNA ウィルスゲノムの全塩基配列解析が急速に進展する。これが、ウイルス遺伝子の機能解析に大きく貢献したことはいうまでもない。さらに、ウイルスゲノムの全長 cDNA を構築して、これから転写された RNA に感染力を持たせる技術が開発された (Ahlquist *et al.*, 1984; Ahlquist and Janda, 1984)。この技術は、RNA をゲノムとするウイルスの遺伝子機能解析に分子遺伝学的手法を導入できるようにした点で、大きくウイルス学に貢献した。

われわれも CIYVV で感染性 cDNA の構築に成功した (Takahashi *et al.*, 1997)。感染性 cDNA が構築できたことは、その後病原性や抵抗性に関与するウイルス遺伝子を特定するのに役立った。特にポティウイルスの場合は、宿主環境の変化でゲノムの塩基置換による変異の選択と淘汰が頻繁に起こる。感染性 cDNA をもつことで、遺伝的に単一なウイルスをはじめに用意して研究が出来るようになり、大きな研究の進展が見られた。例えば、ウイルスに多様な塩基置換の変異が蓄積して、ある作物品種に抵抗性の集団とその抵抗性を打破する集団の混合であった場合は、作物品種の抵抗性の特性は接種試験による選抜で見えてこないことになる。

外被タンパク遺伝子の途中に終止コドンを導入して、タン

[†]平成 22 年 4 月 18 日 平成 22 年度大会で行われた会長講演の要旨

* 北海道大学大学院農学研究院 Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan

パクを発現できないようにした配列で形質転換したタバコが、ウイルスに抵抗性になる (Lindbo and Dougherty, 1992). その分子機構の解析結果から, Post transcriptional gene silencing (PTGS) が提唱された (Lindbo *et al.*, 1993). この仮説は, その後ウイルスの病原性や抵抗性を解析する上で必ず考慮に入れなければならないものとなった. 例えば, モザイクの葉では, 黄色い部分でジーンサイレンシングを抑制するウイルスのサプレッサー遺伝子が機能し, 緑の濃い部分では逆にウイルスの蓄積がジーンサイレンシングで低下している. ポティウイルスでは, HC-Pro 遺伝子をもつ PTGS を抑制する活性が, その病原性に大きく影響することがわかってきた (Kristin and Carrington, 1998; Brigneti *et al.*, 1998).

CIYVV は, 多くの豆科植物にえそを誘導する. われわれはインゲン品種の抵抗性反応を調べる過程で, 抵抗性品種‘白地ビルマ’が, ウイルス接種後えそ病徴を出すはずが, モザイクを呈していることに気がついた. このウイルスをソラマメ品種‘早生’に戻し接種すると野生株のようにえそをおこさずモザイクモザイク病徴を出すことがわかった. 1990 年代前半には, 温室で CIYVV を単病斑分離しながら汁液接種で継代すると病原性が弱まるウイルスが得られる結果を得ていた. ウイルスの変異が日常的に起きていることはわかっていて. そこで, この抵抗性打破もウイルスの弱毒化が原因ではないかを考えた. この頃には感染性 cDNA も構築できていたので, 早速この変異株と野生株のキメラウイルスを作って, 弱毒化に関与するゲノム領域を特定したところ, HC-Pro 遺伝子が原因であることがわかった (Yambao *et al.*, 2008). さらに, CIYVV の PTGS 活性とえそ病徴誘導の相関を調べたところ, 予想通り, この変異株の抑制活性は低下していた. なぜ PTGS 抑制遺伝子の活性低下が弱毒化の原因なのかは, 今後の解析を待たなければならない.

2000 年にシロイヌナズナの全ゲノム塩基配列が解読された (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). このことは, ウイルスの病原性や複製, あるいは宿主のウイルス抵抗性機構の解析が, 将来は宿主遺伝子との相互作用で説明されることを意味した. この成果は, CIYVV の劣勢抵抗性の原因遺伝子の特定にも役立った. 2002 年にポティウイルスである *Tabacco etch virus* に対するシロイヌナズナの感受性喪失の原因遺伝子が *eIF(iso)4E* であることが報告された (Lellis *et al.*, 2002). このころ同様の遺伝学的手法で, キュウリモザイクウイルスが複製するのに必要なシロイヌナズナの宿主因子の特定を, 我々の隣の研究室で行っていて, *eIF4E* 欠損変異株を持っていた (Yoshii *et al.*, 2004). この変異株を譲ってもらい, CIYVV の接種試験をすると, 野生株は感染するのに, 変異株は感染しないことがわかった (Sato *et al.*, 2005). 当時,

いくつかのポティウイルスについて, *eIF4E* もしくは *eIF(iso)4E* が, 劣勢抵抗性を支配する遺伝子であることが報告されていた. そこで, CIYVV のエンドウにおける抵抗性も *eIF4E* で支配されているのではないかと考えて, 感受性と抵抗性系統の *eIF4E* を cDNA クローニングして, 配列を比較したところ, 既に遺伝学的解析をもとに報告されていた *cyv2* をもつ抵抗性系統に限って, 配列が異なることが分かった. さらに感受性の *eIF4E* を抵抗性系統で発現させると, ウイルスを感染させることが出来た. よって, *cyv2* によるエンドウの抵抗性は, *eIF4E* によって支配されていることを明らかに出来た (Andrade *et al.*, 2009).

1990 年代後半には, ウイルス感染をリアルタイムでモニターする方法として green fluorescent protein (GFP) でタグしたウイルスを利用する方法が開発された (Heinlein *et al.*, 1995; Padgett *et al.*, 1996). 我々も CIYVV で安定的に GFP を発現させることが出来たので (Masuta *et al.*, 2000), これを利用して感染をモニターすることにした (Andrade *et al.*, 2007). 抵抗性エンドウは, 通常の汁液接種で感染を確認できなかったが, 感染性 cDNA をパーティクルガン法で接種すると感染点を確認できた. この方法によって, エンドウのウイルス抵抗性が, 二つのタイプに分かれることがわかった. 一つは, GFP 蛍光が感染点に局在して, 隣接細胞にまれにしか広がらない. 一方, もう一つの抵抗性では, 感染点からウイルスが広がったが, その速度は感受性に比べて著しく遅いのが特徴であった. 後者は, 先に述べた *cyv2* 抵抗性遺伝子を持つ系統のエンドウであることが明らかになった (Andrade *et al.*, 2009).

1994 年に, タバコモザイクウイルスの抵抗性遺伝子 *N* がタバコから単離された (Whitham *et al.*, 1994). *N* 遺伝子をもつタバコでは, 過敏間反応細胞死を伴って, 局部病斑を形成する. その後, 過敏間反応細胞死を伴う多くの抵抗性遺伝子が単離され, それら遺伝子が共通の構造を持つことと, シロイヌナズナのゲノム配列の中には, こうした構造を持つ遺伝子, すなわち resistance gene analogue (RGA) が多く存在することがわかった. 一方で, 局部病斑形成だけでなく, ウイルスの全身感染で起こるえそ病徴にも RGA が関与する例が知られるようになった. 例えば, 抵抗性遺伝子 *Rsv1* をもつダイズでは, ダイズモザイクウイルス (SMV) の G7 系統が全身えそ病徴を引き起こす. このダイズでは, 感染に伴って *PR-1* 遺伝子の発現が上昇し, 過敏間反応細胞死と同様の応答が示唆されている (Hajimorad and Hill, 2001). さらに, *Rsv1* の候補遺伝子として RGA が単離されている (Hayes *et al.*, 2004). エンドウの CIYVV 感染に伴うえそ病徴も, 遺伝的に半優勢 1 遺伝子 (*Cyn1*) に支配される (Ravelo *et al.*, 2007) ことや, 過敏間反応細胞死と類似の宿主応答が観察される

(Atsumi *et al.*, 2009) ので, ダイズの *Rsv1* 遺伝子と SMV の応答に類似している. *Cyn1* が RGA かもしれないと考えるのは,それほど奇抜なことではない.

CIYVV のマメ科植物でのえそ誘導のメカニズムを明らかにするためには, *Cyn1* を単離しなければならない. しかし, エンドウのゲノム配列はわかっておらず, 現時点でそれは無謀なことである. 幸い, マメ科のモデル植物としてタルウマゴヤシの全塩基配列がほぼ解明されている. さらに, タルウマゴヤシのエコタイプには, CIYVV が感染するとえそ病斑を形成するものと退緑病斑を形成するものがある. こうした実験系を利用して, CIYVV がえそを誘導するのに関わる宿主因子を単離することは, 将来可能であろう. 今後は, 作物の抵抗性遺伝子や病害応答遺伝子の研究が, モデル植物の情報を基に進み, ウイルス病抵抗性や病原性のメカニズムの解析が大きく進展することを期待している.

ここで紹介した我々の研究は, 旧北海道大学植物ウイルス病学・菌学講座, 現植物病原学研究室や細胞工学研究室のスタッフや大学院生・学生が行ったもので, 彼らの研究に対する熱意と献身による成果である. また文部科学省, 日本学術振興会および日本豆類基金協会からの研究費のサポートによって行われた. ここに記して深謝する.

引用文献

- Ahlquist, P., French, R., Janda, M. and Loesch-Fries, L. S. (1984). Multicomponent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7066–7070.
- Ahlquist, P. and Janda, M. (1984). cDNA Cloning and in vitro transcription of the complete brome mosaic virus genome. *Mol. Cell. Biol.* 4: 2876–2882.
- Andrade, M., Sato, M. and Uyeda, I. (2007). Two resistance modes to *Clover yellow vein virus* in pea characterized by a green fluorescent protein-tagged virus. *Phytopathology* 97: 544–550.
- Andrade, M., Abe, Y., Nakahara, K. S. and Uyeda, I. (2009). The *cyv2* resistance to *Clover yellow vein virus* in pea is controlled by the eukaryotic initiation factor 4E. *J. Gen. Plant Pathol.* 75: 241–249.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 798–815.
- Atsumi, G., Kagaya, U., Kitazawa, H., Nakahara, K. S. and Uyeda, I. (2009). Activation of the salicylic acid signaling pathway enhances *Clover yellow vein virus* virulence in susceptible pea cultivars. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22: 166–175.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.-X., Ji, L.-H., Ding, S.-W. and Baulcombe, D. C. (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* 17: 6739–6749.
- Goelet, P., Lomonosoff, G. P., Butler, P. J., Akam, M. E., Gait, M. J. and Karn, J. (1982). Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 5818–5822.
- Hajimorad, M. R. and Hill, J. H. (2001). Tsv1-mediated resistance against Soybean mosaic virus-N is hypersensitive response-independent at inoculation site, but has the potential to initiate a hypersensitive response-like mechanism. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 587–598.
- Hayes, A. J., Jeong, S. C., Gore, M. A., Yu, Y. G., Buss, G. R., Tolin, S. A. and Marroff, M. A. S. (2004). Recombination within a nucleotide-binding-site/leucine-rich-repeat gene cluster produces new variants conditioning resistance to soybean mosaic virus in soybeans. *Genetics* 166: 493–503.
- Heinlein, M., Epel, B. L., Padgett, H. S. and Beachy, R. N. (1995). Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton. *Science* 270: 1983–1985.
- Kristin, D. and Carrington, J. C. (1998). A counterdefensive strategy of plant viruses: Suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95: 461–470.
- Lellis, A. D., Kasschau, K. D., Whitham, S. A. and Carrington, J. C. (2002). Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for *eIF(iso)4E* during potyvirus infection. *Curr. Biol.* 12: 1046–1051.
- Lindbo, J. A. and Dougherty, W. G. (1992). Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* 189: 725–733.
- Lindbo, J. A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W. M. and Dougherty, W. G. (1993). Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 5: 1749–1759.
- Masuta, C., Yamana, T., Takahashi, Y., Uyeda, I., Sato, M., Ueda, S. and Matsumura, T. (2000). Development of clover yellow vein virus as an efficient, stable gene-expression system for legume species. *Plant J.* 23: 539–546.
- Padgett, H. S., Epel, B. L., Kahn, T. W., Heinlein, M., Watanabe, Y. and Beachy, R. N. (1996). Distribution of tobamovirus movement protein in infected cells and implications for cell-to-cell spread of infection. *Plant J.* 10: 1079–1088.
- Ravelo, G., Kagaya, U., Inukai, T., Sato, M. and Uyeda, I. (2007). Genetic analysis of lethal tip necrosis induced by *Clover yellow vein virus* infection in pea. *J. Gen. Plant Pathol.* 73: 59–65.
- Sato, M., Nakahara, K., Yoshii, M., Ishikawa, M. and Uyeda, I. (2005). Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor 4E family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by potyviruses. *FEBS Lett.* 579: 1167–1171.
- Shukla, D. D. and Ward, C. W. (1988). Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the potyvirus group. *J. Gen. Virol.* 69: 2703–2710.
- Takahashi, Y., Takahashi, T. and Uyeda, I. (1997). A cDNA clone to *Clover yellow vein potyvirus* genome is highly infectious. *Virus Genes* 14: 235–243.
- Uyeda, I., Kojima, M. and Murayama, D. (1975). Purification and serology of bean yellow mosaic virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 41: 192–203.
- Uyeda, I. (1992). Bean yellow mosaic virus subgroup: Search for the group specific sequences in the 3' terminal region in the genome. *Arch. Virol. [Suppl. 5]*: 377–385.
- Whitham, S., Dinesh-Kumar, S. P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C. and

- Baker, B. (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: Similarity to Toll and the Interleukin-1 receptor. *Cell* 79: 1101–1115.
- Yambao, M. L. M., Yagihashi, H., Sekiguchi, H., Sekiguchi, T., Sasaki, T., Sato, M., Atsumi, G., Takahashi, Y., Nakahara, K. S. and Uyeda, I. (2008). Point mutations in helper component protease of clover yellow vein virus are associated with the attenuation of RNA-silencing suppression activity and symptom expression in broad bean. *Arch. Virol.* 153: 105–115.
- Yoshii, M., Nishikiori, M., Tomita, K., Yoshioka, N., Kozuka, R., Naito, S. and Ishikawa, M. (2004). The *Arabidopsis Cucumovirus multiplication 1* and *2* loci encode translation initiation factors 4E and 4G. *J. Virol.* 78: 6102–6111.