

氏名(本籍) ^{なか}中 ^{むら}村 ^{しげ}茂 ^お雄

学位の種類 博士 (農学)

学位記番号 農 第 579 号

学位授与年月日 平成 9 年 11 月 13 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 遺伝子組換えによるウイルス抵抗性植物作出に関する研究

論文審査委員 (主査) 教授 江 原 淑 夫
教授 玉 木 佳 男
教授 亀 谷 壽 昭

論文内容要旨

ウイルス病は、糸状菌病、細菌病と並んで農作物に多大な被害をもたらす重要な病害の一つである。しかしながら、実用的な抗ウイルス剤が未だ開発されていないため、その防除は専ら感染植物の除去や媒介昆虫の駆除に頼らざるをえないのが現状である。

このような状況のなかで、近年急速に発展した植物組織培養技術と遺伝子組み換え技術とが合体し、外来遺伝子を導入したウイルス抵抗性植物が作出された。すなわち、タバコモザイクウイルス(TMV)外被タンパク質(CP)遺伝子のアグロバクテリウムを介したタバコへの導入が最初に報告された。この形質転換タバコはTMVのCPを恒常的に発現しており、TMVの感染に対し抵抗性を示した。それ以降、この原理を他のウイルスにも応用した成功例が次々と報告されるようになり、植物ウイルス全般に応用可能な技術であることが確認された。その後、ウイルス複製酵素遺伝子、ウイルス細胞間移行タンパク質遺伝子など外被タンパク質以外のウイルス由来遺伝子を導入した植物においてもウイルス抵抗性が認められるということが明らかとなった。更に最近では、リボソーム不活化タンパク質遺伝子やウイルス特異抗体遺伝子などウイルス以外の遺伝子を用いた抗ウイルス形質転換体が作出された。しかしながら、それらはウイルス増殖抑制効果が不十分であったり、植物自体に障害が現れるなど、実用化に問題を残した。またそれらの形質転換体でのウイルス抵抗性機構も充分解明されているとは言えない。

本研究では、遺伝子組換えによるウイルス抵抗性植物の作出を更に発展させることを目的とし、ウイルスの外被タンパク質遺伝子、アンチセンス導入法も含め、新たな試みとしてウイルスRNAを特異的に切断するリボザイムの利用、またウイルスゲノムに由来しない遺伝子として哺乳動物のもつ抗ウイルス機構に着目し、これを担う遺伝子を植物に導入して、それぞれの形質転換植物のウイルス抵抗性のレベルや特徴を比較検討した。

第1章 ウイルス外被タンパク質遺伝子を利用したポティウイルス抵抗性

ポティウイルスは植物ウイルスの中で最も多く、また農業上最も大きな被害をもたらすウイルス群である。インゲンマメ黄斑モザイクウイルス(BYMV)は主にマメ科を宿主とするポティウイルスのなかで最も重要なウイルスであり、血清学的に近縁とされるクローバ葉脈黄化ウイルス(CIYVV)と共に、日本全国のソラマメやインゲンマメに大きな被害をもたらしている。本研究では、まずBYMV抵抗性植物の作出を目的とし、BYMVのゲノムRNAの全塩基配列を決

定し、その構造を明らかにした(第1図)。このCP遺伝子に翻訳開始コドンが付加し、タバコと *Nicotiana benthamiana* を形質転換したところ、タバコ、*N. benthamiana* のいずれも充分検出できるレベルのCPを発現しており、その発現量は1mg組織あたり2-10ngであった(第2図)。

BYMVはタバコには感染しないため、抵抗性の検定は多くのポテウイルスが感染する *N. benthamiana* を用い、R1世代の植物にBYMVを接種して上位葉における発病を観察した(第3図)。その結果、非形質転換体は接種後11日で全個体が発病したのに対し、CP導入個体は接種14日後でも30%(B801系統)、10%(B805系統)しか発病せず、強いBYMV抵抗性を示した。次に、このウイルス抵抗性のスペクトルの広さを確かめるため、BYMVと近縁のポテウイルスであるCIYVVと遠縁のポテウイルスであるジャガイモYウイルス(PVY)を同様に接種した。B805系統にCIYVVを接種したところ、1日程度の発病の遅延が認められたものの接種13日目には全個体発病し、ほとんど抵抗性は認められなかった(第4図)。さらにPVYを接種したところ、B801、B805系統共に全く抵抗性を示さず接種後11日目までに全個体発病した(第5図)。このことから、BYMV CP導入植物は、ホモログなBYMVに対しては抵抗性を示すが、近縁なポテウイルスであるCIYVVに対してはほとんど抵抗性が認められず、遠縁のポテウイルスであるPVYには全く抵抗性を示さないことが明らかとなった。

第2章 リボザイム、アンチセンスおよび外被タンパク質遺伝子導入タバコ におけるキュウリモザイクウイルス抵抗性

リボザイムは自己切断活性をもったRNA分子であり、様々な生物から見いだされている。なかでも植物ウイルスのサテライトRNA由来のハンマーヘッド型リボザイムは、その単純な構造からトランスに作用させることも容易であり、生体内での特定遺伝子の発現抑制に応用が期待されている。しかしながら、植物ウイルスRNAの切断に関しては *In vitro* での実験例のみで、*In vivo* の実験例はない。そこで多くの農作物にモザイク病を引き起こす多犯性のキュウリモザイクウイルス(CMV)の3a遺伝子をターゲットとして、そのコード領域約860bpのアンチセンスに1箇所または2箇所リボザイム配列を組み込んだ改変遺伝子を構築し、タバコに導入した。対照にはリボザイム配列を含まないアンチセンス、そしてCP遺伝子導入タバコを用い、CMVに対する抵抗性を比較してリボザイムの応用の可能性を検討した。

構築した3種類のリボザイム(第6図)の切断活性を確認するため、*In vitro* で転写したリボザイムRNAを粒子より精製したCMV RNAと混和し、反応後アガロース電気泳動を行ってそのパターンを比較した(第7図)。65℃で10分間熱変性を行った場合、Rz2, Rz3, Rz4のリボザイムを混和したものは予想された長さのRNA3の切断片が確認され、またいずれの場合もRNA3以外の成分については変化がなく、今回構築したリボザイムの活性とその特異性が確認された。一方、リボザイム配列を含まないAs5ではCMV RNAに変化はなかった。しかしながら、反応前の熱変性を省いた場合、いずれのリボザイムもその切断活性が著しく低下した。

上記の3種類のリボザイム(Rz2, Rz3, Rz4)と対照のアンチセンス(As5)、外被タンパク質(CP)の発現ベクターを用いてタバコを形質転換した。得られた形質転換体のR1世代を用いてCMV抵抗性検定を行ったところ、Rz204, As508, CP711の3系統が比較的強い抵抗性を示したため、更なる検定を行った。まずそれぞれの系統の抵抗性程度を調べるため、2, 10, 50 μ g/mlと3段階の濃度でCMVを接種した(第8図)。その結果、CP711は低濃度接種でほぼ完全の非常に強い抵抗性を示したが、高濃度のウイルスを接種した場合には発病が遅延するだけで全個体が発病した。すなわちCP711の抵抗性は高濃度ウイルス接種により打破される発病遅延型であった。一方Rz204は、高濃度接種でも全個体が発病することはなく、発病遅延型と無病微型が混在していた。As508はCP711と同様に、高濃度接種でその抵抗性が打破された。

次にR2世代Rz204-1にCMVを接種したところ、R1世代と同様に抵抗性のばらつきが観察され、高度抵抗性(HR)、中度抵抗性(MR)、低度抵抗性(LR)の3つのタイプに分類された。これら抵抗性の異なる個体におけるウイルス増殖の違いを明らかにするため、葉位毎のウイルス蓄積量をELISA法で調べたところ、病徴の激しい個体・葉位ほどウイルスの蓄積量が多く、ウイルスの移行・増殖と病徴発現とが一致することが確認された(第9図)。

Rz204後代において見いだされた抵抗性のばらつきと導入遺伝子の発現との関係を明らかにするため、接種7日後に接種葉(第6葉)と上位葉(第8葉)を採取し、全RNAを抽出してノーザン解析を行った(第10図)。その結果、ウイルスRNAの蓄積は病徴と一致し、Rz204-1のHRタイプの上位葉では全くウイルスRNAは検出されず、LRタイプはAs508-1(Sタイプ:抵抗性なし)やCP711-3(LRとSタイプ)と同等以上にウイルスRNAの蓄積が認められた。一方、トランスジーンRNAの蓄積量はCP711-3の場合は抵抗性の程度と比例し、LRタイプで多く、Sタイプで少なかった。またR1世代では抵抗性が認められたにも関わらず、R2世代で抵抗性が全く消失

してしまったAs508においては、全くトランスジーン蓄積が認められなかった。これに対しRz204-1のHRタイプはシグナルの総量としてはLRタイプより多かったが、分子量が完全長の約半分と推定される分解産物が接種葉、上位葉共に検出され、その量は接種葉では完全長の転写産物とほぼ同量であり、上位葉では完全長の転写産物がほとんど検出されず大部分が分解産物であった。このような分解産物はRz204-1のLRタイプでは検出されなかった。このことからRz204-1のHRタイプにおいてはトランスジーンRNAの分解が生じており、その活性は上位葉でより高いことが明らかとなった。また接種前のトランスジーンRNAの蓄積量は抵抗性の弱い個体ほど多く検出され、接種後はその差が更に明瞭になり、MRタイプやHRタイプではほとんど検出されなかった(第11図)。このことからRz204後代の抵抗性の程度とトランスジーン蓄積量の間には負の相関があると確認された。

導入遺伝子の不活化現象(gene silencing)は、導入遺伝子の複数コピーがゲノムに組み込まれた場合に生じやすいことが示されている。Rz204のR1世代はカナマイシン培地上での耐性：感受性の分離比が3：1であることから、カナマイシン耐性遺伝子に関しては1コピー導入されていると予想され、Rz204-6は1遺伝子座ホモ系統と思われる。Rz204後代で観察された抵抗性のばらつきが導入遺伝子の接合性によって支配されているかどうかを確かめるため、非形質転換体にホモ系統のRz204-6-23を交配し、ヘテロ系統WT×Rz204-6-23を作出した。そしてこのヘテロ系統とRz204-6-23自殖系統とのウイルス抵抗性のレベルを比較したところ、自殖ホモ系統はその親と同様に全く全身発病せず、すべてHRタイプの抵抗性を示した(第12図)。それに対し交配したヘテロ系統は分離世代R1の抵抗性と同様にHRタイプからLRタイプまで様々な抵抗性を示し、導入遺伝子のヘテロ化によって抵抗性のタイプも多様化した。ここで作出したヘテロ系統とホモ系統における導入遺伝子のゲノム上での存在を確認するため、それぞれの個体のゲノムDNAを用いてサザン解析を行った(第13図)。その結果、ホモ系統Rz204-6-23selfもヘテロ系統WT×Rz204-6-23も導入遺伝子は3遺伝子座であり、そのうち2遺伝子座は断片の長さから不完全な形で挿入されたものと考えられた。

第3章 哺乳動物抗ウイルス機構を利用した複数ウイルス抵抗性

ウイルス感染動物細胞ではウイルス増殖抑制因子としてインターフェロンが生成することが

知られている。インターフェロンは2', 5'-oligoadenylate synthetase - nuclease system, P1/eIF-2 α protein kinase - phosphoprotein phosphatase system や Mxタンパク質の合成等を誘導し、ウイルスや感染細胞の増殖を阻害する。本研究では、このインターフェロンシステムに着目し、インターフェロンの作用によって誘導される2', 5'-oligoadenylate synthetase (2-5Aase), double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR)を植物に導入することにより、全てのRNAウイルスに対する抵抗性付与を試みた。2-5Aaseはインターフェロンによって誘導される遺伝子のひとつで、二本鎖RNAによって活性化され、ATPを2', 5'-ホスホジエステル結合で重合し2', 5'-Aを合成する。2', 5'-Aは細胞内に不活化型として存在するRNaseLに結合してこれを活性化し、細胞内RNAの分解を促進してウイルスの増殖を抑制する。植物細胞においてRNaseLの存在は確認されていないが、もし同様の働きをもつRNaseが存在すれば、RNAウイルス全てに対する抵抗性が期待される。またPKRもインターフェロンによって誘導される遺伝子で、二本鎖RNAと結合して活性化し、eIF-2 α をリン酸化することによりタンパク質合成を阻害する。いずれの遺伝子も二本鎖RNA、すなわちRNAウイルス複製中間体(もしくは二本鎖RNAウイルスゲノム)と結合してその活性化が起こるという誘導型であり、ウイルスが感染していない健全植物では植物に害作用はなく、RNAウイルス感染細胞でのみ抗ウイルス作用が発揮されると期待される。

2-5Aase導入タバコについては、カナマイシン耐性遺伝子の導入が確認された32個体中、2-5Aase遺伝子の導入も確認された個体は29個体得られたが、予備検定および1次検定の結果、有意なCMV増殖の抑制が確認されたのは、ME116ただ1個体であった(第14図)。このME116のR1個体を用いてノーザン解析を行ったところ、適切な位置に明瞭なバンドが検出され、マウス2-5Aaseの発現が確認された(第15図)。一方、PKR導入タバコについては、カナマイシン耐性遺伝子の導入が確認された個体は36個体得られたが、そのうちPKR遺伝子の導入も確認されたのはPK1の1個体のみであった。このPK1のR1個体についてノーザン解析を行ったところ、予想される位置にシグナルは検出されなかった(第15図)。

導入遺伝子の発現が確認され、1次検定でもCMV接種葉におけるウイルス増殖抑制が認められたME116のR1世代を用いて、CMVとPVYに対する抵抗性を検討した。CMVとPVYについては、接種後の上位葉の病徴発現を経時的に観察した(第16図、第17図)。その結果、CMV、PVYいずれの場合も非形質転換体と比べて1~3日の発病遅延が認められ、グループの異なる2

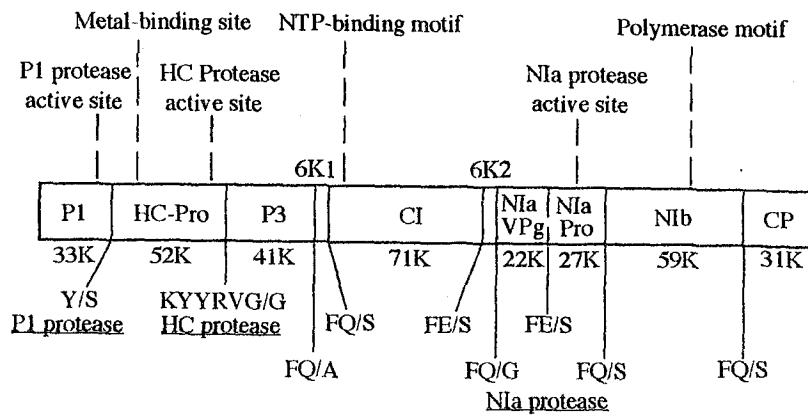
種のウイルスに抵抗性を示すことが明らかとなった。しかしながら、いずれの場合も発病遅延後に全株発病し、またCMV接種の場合、対照として加えたCMV外被タンパク質導入タバコ(CP711)より抵抗性は弱かった。

PKR遺伝子が導入されたタバコは1個体(PK1)しか得られなかったため、このPK1のR1世代を用いて、CMVとTMVに対する抵抗性を検討した。その結果、CMV接種に対し病徴発現の遅延と病徴の軽減が認められ、またTMV接種に対し接種葉局部病斑数の減少が認められた(第18図、第19図)。いずれも強い抵抗性ではないが、グループの異なる2種のウイルスに対する抵抗性が確認された。

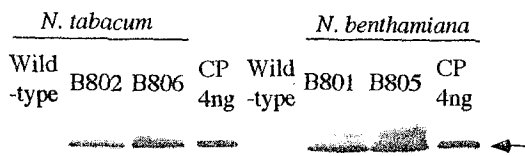
まとめ

遺伝子組換えを利用したウイルス抵抗性植物作出を更に発展させることを目的とし、ウイルス外被タンパク質、リボザイム、アンチセンス、インターフェロン誘導性抗ウイルス遺伝子を導入した形質転換植物を作出し、以下の結果を得た。

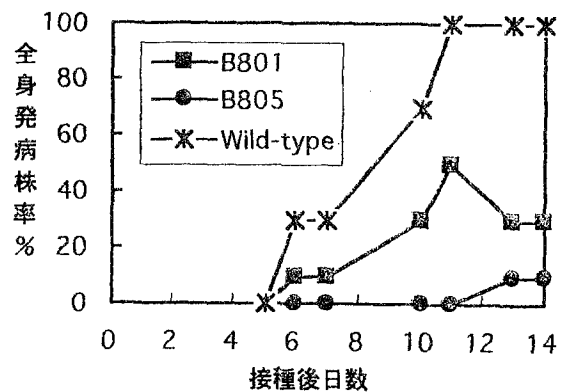
- 1) BYMVのゲノムRNAの全塩基配列を決定し、外被タンパク質遺伝子を *N. benthamiana* に導入した。この形質転換体はホモロガスなBYMVに対しては抵抗性を示したが、ヘテロロガスなポティウイルスには十分な抵抗性を示さなかった。
- 3) CMV 3a遺伝子を切断するようにデザインしたリボザイムは、*in vitro*でCMV RNA3を切断したが、反応前に熱変性を行わない場合は著しく切断活性が低かった。
- 3) CMV外被タンパク質遺伝子導入タバコ、3aアンチセンス導入タバコのすべて、およびほとんどのリボザイム導入タバコのCMV抵抗性は、高濃度のCMV接種により打破され、病徴遅延型であったが、リボザイム導入個体の1系統は高濃度のウイルス接種によっても打破されない無病徴型の高度抵抗性を示した。
- 4) 高度抵抗性を示したりボザイム導入タバコ個体において、トランスジーンRNAの部分分解産物が検出され、トランスジーンRNAの不活化によるウイルス抵抗性獲得が予想された。
- 5) 哺乳動物の2-5AaseおよびPKR遺伝子を導入したタバコは、複数ウイルス抵抗性を獲得した。



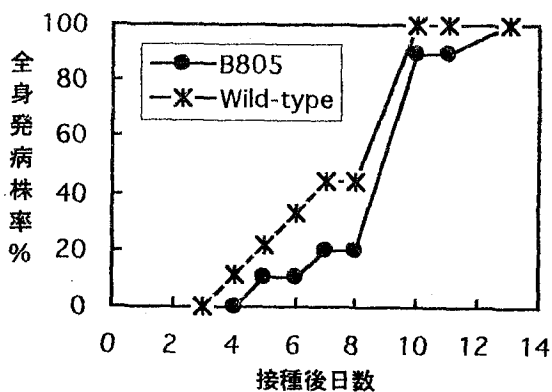
第1図 BYMV遺伝子の予想される構造
 上部は見いだされたモチーフ，下部はプロテアーゼの予想認識配列を示す。



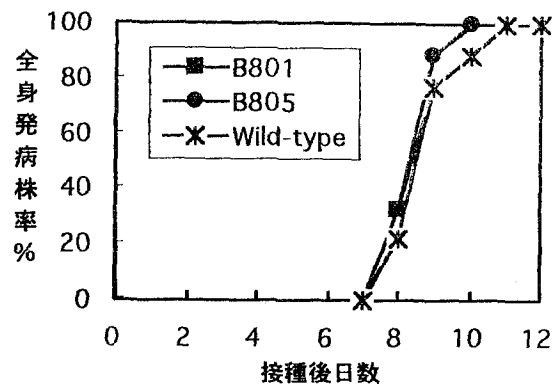
第2図 形質転換体R0世代のウエスタン解析
 1レーンあたり1mg組織相当のSDS可溶タンパク質を泳動した。矢印は31kDaの位置を示す。



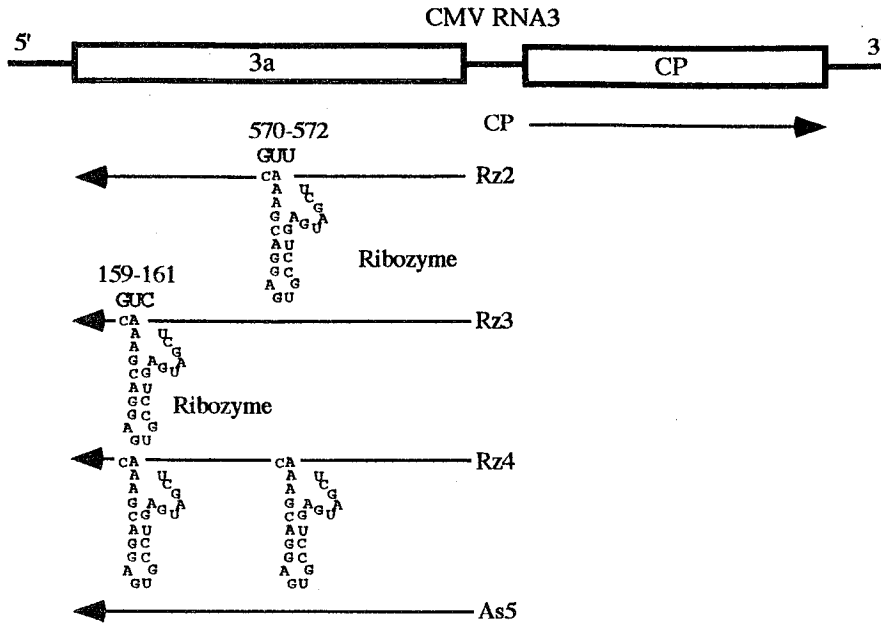
第3図 形質転換N. benthamianaのBYMV抵抗性



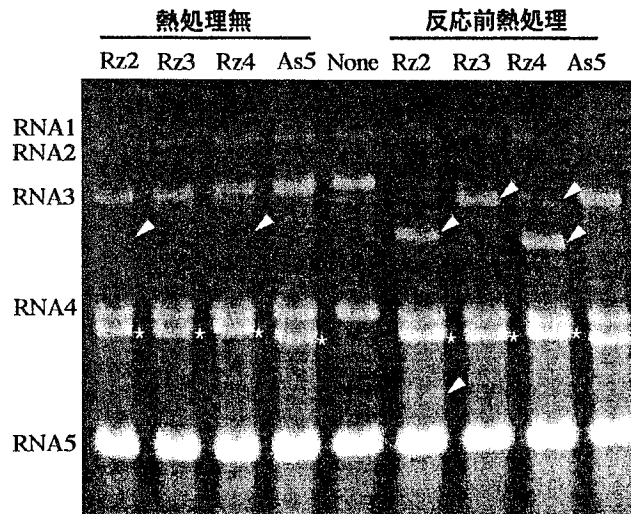
第4図 形質転換N. benthamianaのCIYV抵抗性



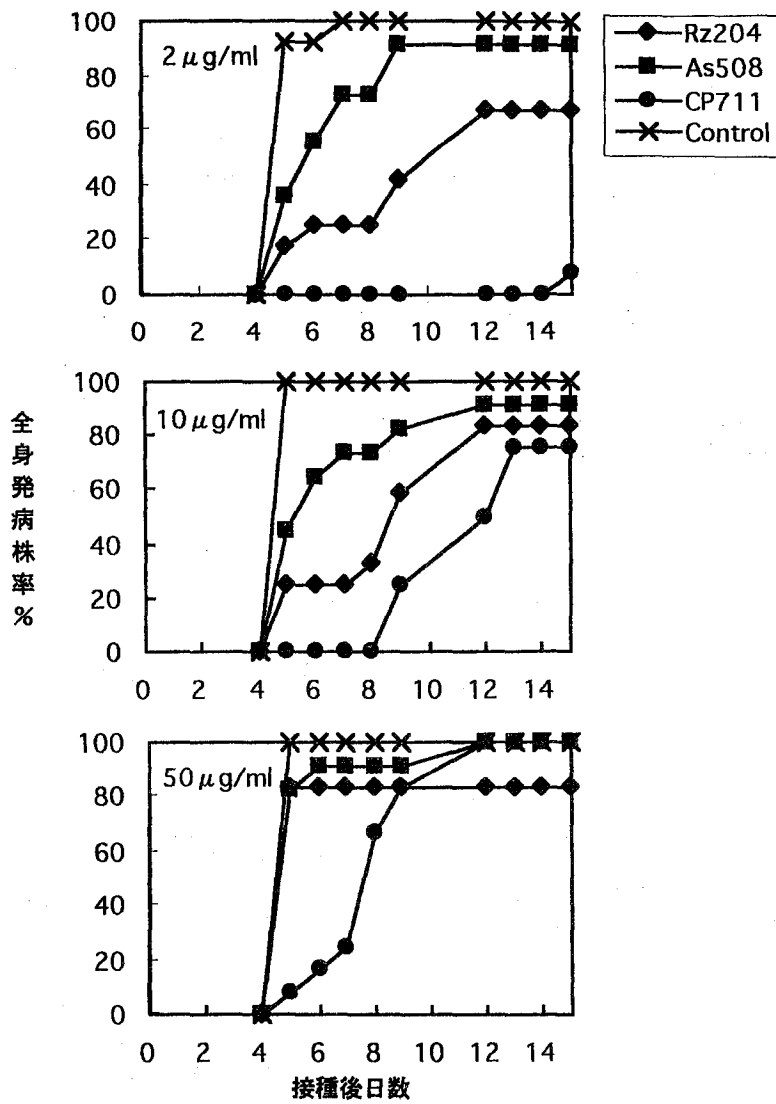
第5図 形質転換N. benthamianaのPVY抵抗性



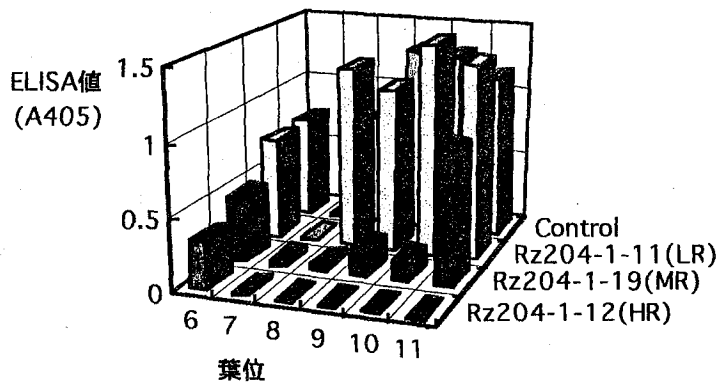
第6図 リボザイム、アンチセンスおよびCP遺伝子の構築
矢印は転写方向を示す。



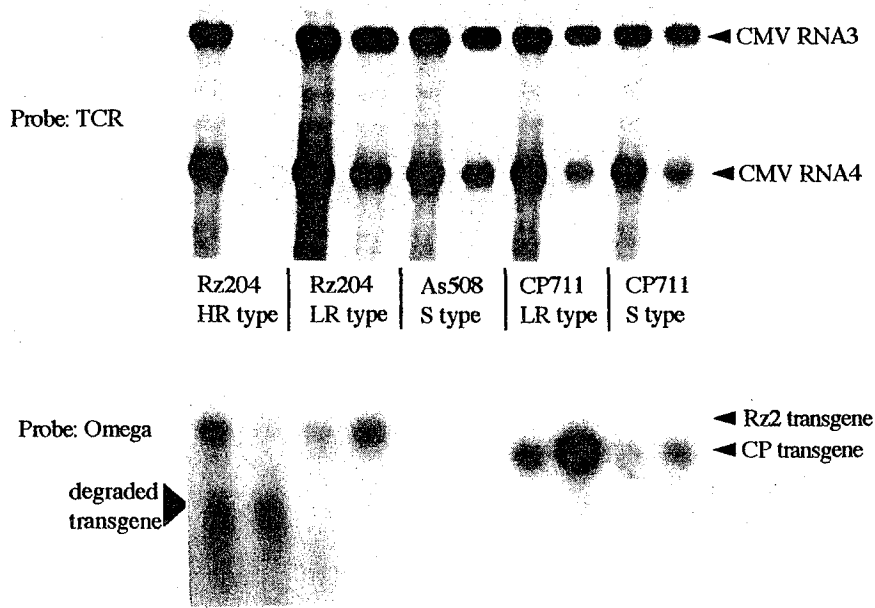
第7図 *in vitro* におけるリボザイムによるCMV RNA3の切断
*in vitro*で転写したリボザイム(Rz2, Rz3, Rz4)とアンチセンス
(As5)をCMV RNAと混和した。白抜きarrow headは切断され
たCMV RNA3, asteriskは転写RNAを示す。Noneは転写RNA
を混和しないCMV RNAのみのもの。



第8図 ウイルス接種濃度の違いによるCMV抵抗性の変化

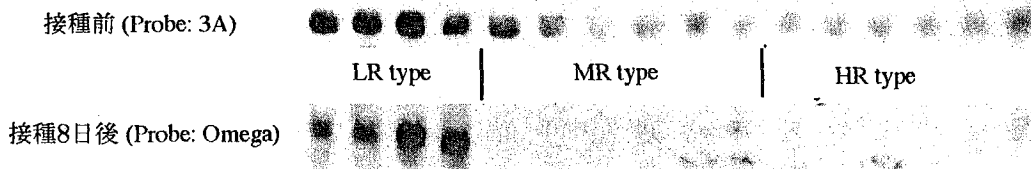


第9図 Rz204-1後代における葉位ごとのウイルス蓄積量
第6葉に接種し、接種8日後に測定した。

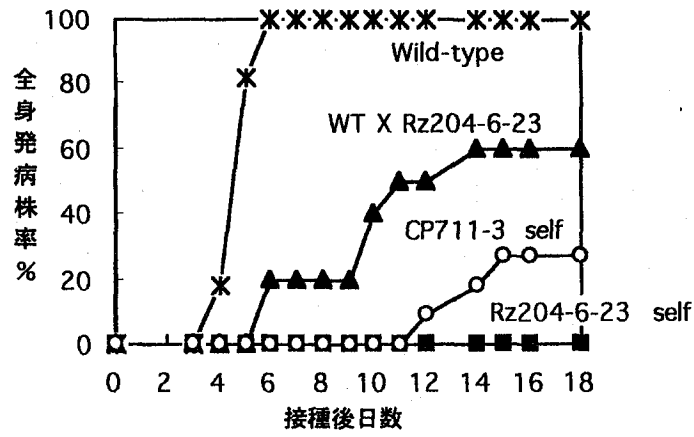


第10図 R2植物におけるウイルス接種7日後のウイルスRNAとトランスジーンRNAの検出

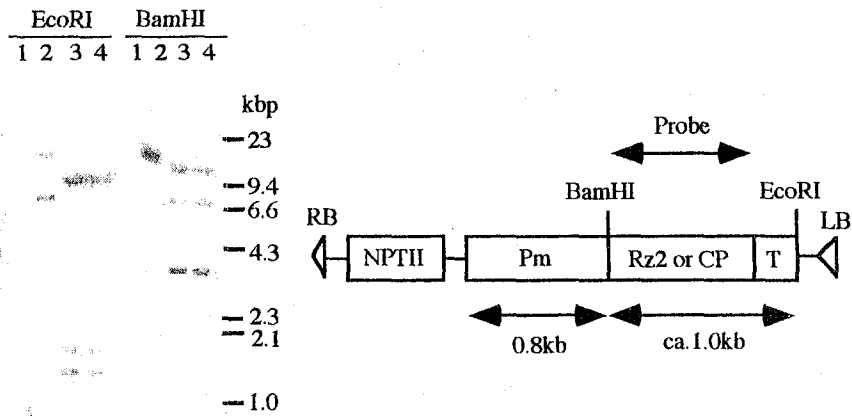
上下同一サンプルをプロットし、上のシートはTCRプローブによりウイルスRNAを、下のシートはOmegaプローブによりトランスジーンをそれぞれ特異的に検出した。HR, LRは表2-2に示したレベルの抵抗性を示す。Sは全く抵抗性が認められない個体。それぞれ左レーンが接種葉、右レーンが非接種上位葉。



第11図 Rz204後代(R2)植物の接種前(第5葉:接種葉)と接種8日後(第8葉:非接種葉)におけるトランスジーンRNAの蓄積量 シートの上下は同一個体由来。

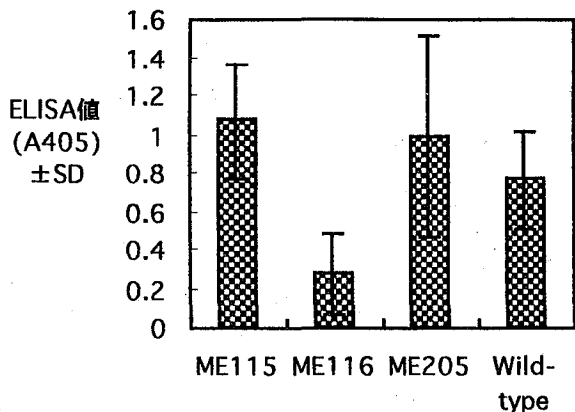


第12図 Rz204自殖後代および非形質転換体との交配個体における抵抗性

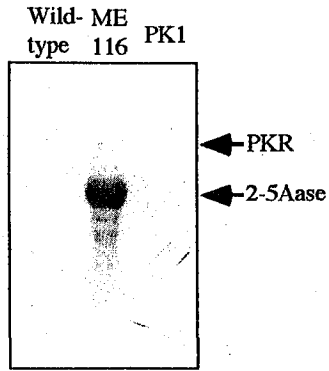


第13図 形質転換体のゲノミックサザン解析

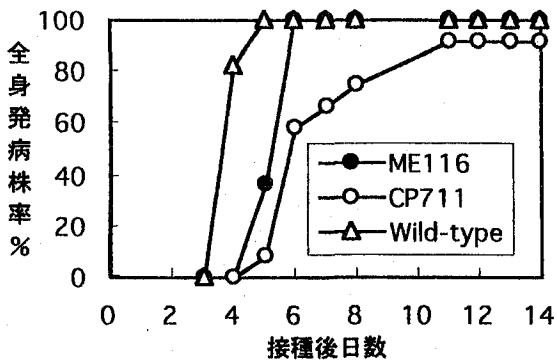
lane1: Wild-type, lane2: CP711-3 self,
lane3: Rz204-6-23 self, lane4: Wild-type × Rz204-6-23



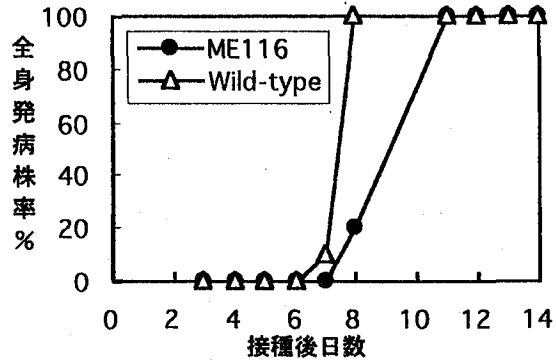
第14図 2-5Aase導入タバコ当代の1次検定 (CMV接種葉のウイルス増殖)



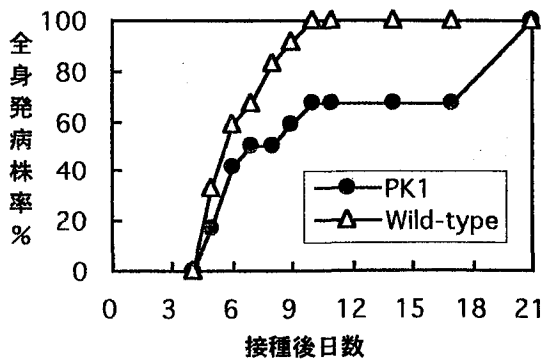
第15図 2-5Aase遺伝子, PKR 遺伝子導入タバコにおける導入 遺伝子の発現
プローブはPCRラベルした2-5Aase cDNA, PKR cDNAを混和して用いた。矢印はトランスジーン転写産物の位置を示す。



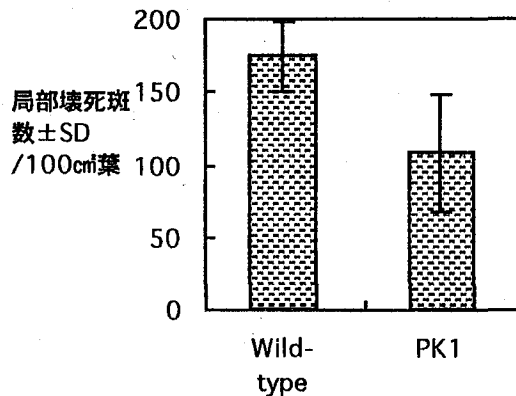
第16図 2-5Aase遺伝子導入タバコのCMV抵抗性



第17図 2-5Aase遺伝子導入タバコのPVY抵抗性



第18図 PKR遺伝子導入タバコのCMV抵抗性



第19図 PKR遺伝子導入タバコのTMV抵抗性

論文審査結果要旨

ウイルス病は、農作物に多大な被害をもたらす重要な病害の一つであるが、実用的な抗ウイルス剤が未だ開発されておらず、防除は感染植物の除去や媒介昆虫の駆除によっているのが現状である。近年外来遺伝子導入による形質転換ウイルス抵抗性植物の作出が進められてきている。

本研究では、遺伝子組換えによるウイルス抵抗性植物の作出を更に発展させることを目的とし、ウイルスの外被タンパク質遺伝子、アンチセンス導入法も含め、新たな試みとしてウイルス RNA を特異的に切断するリボザイム、またウイルスゲノムに由来しない遺伝子として哺乳動物のもつ抗ウイルス機構に着目し、これを担う遺伝子を植物に導入した形質転換植物を作出し、ウイルス抵抗性のレベルや特徴を比較検討し、以下の結果を得た。

1) 宮城県においてソラマメに大きな被害をもたらしているインゲンマメ黄斑モザイクウイルス (BYMV) に対応するため BYMV のゲノム RNA の全塩基配列を決定し、外被タンパク質遺伝子を *N. benthamiana* に導入した。この形質転換体はヘテロガスなポテトウイルスには十分な抵抗性を示さなかったが、ホモガスな BYMV に対しては抵抗性を示し、今後のソラマメの導入に向けての展望を開いた。2) キュウリモザイクウイルス (CMV) の 3a 遺伝子を切断するようにデザインしたリボザイムは、*in vitro* で CMV RNA3 を切断したが、反応前に熱変性を行わない場合は著しく切断活性は低い。CMV 外被タンパク質遺伝子導入タバコ、3a アンチセンス導入タバコのすべておよびほとんどのリボザイム導入タバコの CMV 抵抗性は、高濃度の CMV 接種により打破され、病徴遅延型であったが、リボザイム導入個体の 1 系統は高濃度のウイルス接種によっても打破されない無病徴型の高度抵抗性を示した。3) 高度抵抗性を示したリボザイム導入タバコ個体において、トランスジーン RNA の部分分解産物が検出され、トランスジーン RNA の不活化によるウイルス抵抗性獲得が予想された。4) 哺乳動物のインターフェロンシステム関連の 2, 5-oligoadenylate synthetase および double stranded RNA-dependent protein kinase 遺伝子を導入したタバコは、複数ウイルス抵抗性を獲得した。

以上のように本論文はウイルス抵抗性の形質転換植物作出上重要な多くの新知見を示したもので、審査員一同は博士 (農学) の学位を授与するに値すると判定した。