

リンゴクロロティックリーフスポットウイルスの
外被タンパク質と細胞間移行タンパク質の
多機能性の解析

2008

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物環境科学専攻
(岩手大学)
八重樫 元

第1章 緒言	1
第2章 リンゴクロロティックリーフスポットウイルス外被タンパク質 (ACLSV-CP)のアミノ酸変異の解析	8
1. 材料と方法	8
(1) Ti プラスミドを基にした ACLSV 感染性 cDNA クローン (pBICLSF)の構築	8
(2) pBICLSF を基にした変異型 cDNA クローンの作出	13
(3) 変異型 CP を一過的に発現する Ti プラスミドの作出	15
(4) アグロインフィルトレーション	17
(5) RNA 抽出	19
(6) ノーザンブロット分析	21
(7) イムノブロット分析	23
2. 結果	24
(1) 変異型 cDNA クローンをアグロインフィルトレーションした 葉組織からのウイルスゲノム RNA の検出	24
(2) CP 変異型 cDNA クローンの植物細胞での複製能	27
(3) 変異型 CP の植物細胞での安定性	29
3. 考察	31
第3章 ACLSV とリンゴ小球形潜在ウイルス(ALSV)の RNA サイレンシングサプレッサーの同定	36
1. 材料と方法	36
(1) アグロインフィルトレーションアッセイに用いた Ti プラスミド	36
(2) アグロインフィルトレーション	42
(3) GFP 蛍光観察	44

(4) RNA 抽出	44
(5) ノーザンブロット分析	45
(6) イムノブロット分析	46
2. 結果	46
(1) ACLSV 遺伝子(P216, P50, CP)のローカルサイレンシング抑制能	46
(2) P50 のシステミックサイレンシング抑制能	51
(3) P50 のサイレンシングシグナル移行阻害	56
(4) ALSV-RNA2 にコードされる遺伝子(42KP, Vp25, Vp24, Vp20) のサイレンシング抑制能	60
3. 考察	69
第4章 ACLSV-P50 のシステミックサイレンシング抑制機構の解析	73
1. 材料と方法	73
(1) 欠失型 P50 変異体を一過的に発現する Ti プラスミド	73
(2) P50 発現形質転換 <i>Nicotiana benthamiana</i> の作出	73
(3) 接木試験	75
(4) ゲルシフト解析	77
(5) アグロインフィルトレーション	82
(6) GFP 蛍光観察	82
(7) イムノブロット分析	82
2. 結果	83
(1) 欠質型 P50 変異体のシステミックサイレンシング抑制能	83
(2) P50 発現植物でのサイレンシングシグナル移行の阻害	83
(3) P50 の RNA 結合特性	91
3. 考察	94

第5章 総合考察	99
摘要	106
引用文献	110

第1章

緒言

植物ウイルスは次の4つの過程を経て植物体の全身に感染する。すなわち、植物細胞への侵入、侵入した細胞でのウイルス複製、第一次感染細胞から隣接する細胞への原形質連絡を介した細胞間移行、そして師管を利用した組織間移行である。植物体に全身感染したウイルスは、罹病植物から機械的な接触、接木など的人為的な接触、あるいは節足動物、線虫、菌などの媒介生物により健全植物に伝播し感染を拡大していく。これらの過程はウイルスと植物あるいは媒介生物との複雑な相互作用により成り立っている。植物ウイルスは植物個体レベルでの全身感染および植物個体間での伝播を成立させるためにウイルスゲノムに様々な遺伝子をコードしており、そのほとんどはタンパク質として機能するものである。しかしながら、遺伝子数はウイルス種または属によって異なり、少ないもので3種類、多いものでも数10種類とその数は決して多いとは言えない。このような限られた遺伝子を最大限に利用するため、植物ウイルスは一つのタンパク質が複数の機能を持つ、すなわち多機能性タンパク質をコードしている。

ほとんどの植物ウイルスは、自身のゲノムを増幅させるための複製関連タンパク質、ウイルスの細胞間移行を行うための細胞間移行タンパク質 (MP)、ウイルス粒子を形成するための外被タンパク質をコードしており、これらのタンパク質はウイルス感染を成立させるために基本的な役割を果たしている。しかしながら、これらのタンパク質も多機能性を示す例がある。例えば、アルファモウイルス属のアルファアルファモザイクウイルス (*Alfalfa mosaic virus* ; AMV) ではウイルス複製に2種の複製関連タンパク質 (P1、P2) に加えて CP を必要

とする (5、6、28)。一方、ポテックスウイルス属のジャガイモウイルス X (*Potato virus X*; PVX) では細胞間移行するのにトリプルジーンブロック (TGB) と呼ばれる 3 種類の細胞間移行タンパク質 (P25、P12、P8) に加えて CP が必要であることが明らかになっている (88)。このように CP の粒子形成以外の機能は AMV と PVX では異なることから、ウイルスタンパク質の多機能性はウイルスの感染過程の多様性を産み出す要因の一つであると考えられる。

植物ウイルスがコードする多機能性タンパク質の代表例としてポチウイルスがコードするヘルパーコンポネントプロテアーゼタンパク質 (HCPro) が挙げられる (55)。これまでに報告されている HCPro の特性を以下に示すと、1) 二量体形成能 (85) ; 2) アブラムシ伝播能 (66) ; 3) プロテアーゼ活性と細胞間移行能 (12、71) ; 4) ウイルス複製と長距離移行能 (17) ; 5) RNA サイレンシングサプレッサー活性 (2、7、40、41) である。これらの中で特に注目すべきは HCPro の RNA サイレンシングサプレッサーとしての機能である。

RNA サイレンシングは真核生物に広く保存された塩基配列特異的 RNA 分解機構であり、植物では転写後ジーンサイレンシング (PTGS)、カビでは quelling センチュウ、ショウジョウバエおよびヒトなどの動物では RNA interference (RNAi) と呼ばれている (16、32、107)。この RNA 分解機構は二本鎖 RNA によって誘導され、二本鎖 RNA は DICER と呼ばれる RNase III 様酵素により 21 から 25 塩基の small interfering RNA (siRNA) に切断される (29)。これらの siRNA は RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) と呼ばれるタンパク質の複合体に取り込まれ、この RISC は取り込んだ siRNA と相補的な配列を持つ標的 RNA を分解する (31)。

植物では、RNA サイレンシングはウイルスやウイロイド、またはトランスポゾンなどの分子寄生体に対する抵抗性機構として働いている (3、20、86、89、

96)。植物ウイルス感染細胞ではウイルスゲノムの高次構造または複製中間体が二本鎖 RNA を形成することでウイルスゲノムに対するサイレンシングが誘導され、ウイルス複製および蓄積が抑制される。一方、サイレンシングが誘導された細胞では標的 RNA 配列の情報を持ったサイレンシングシグナルが産生し、細胞間および組織間移行し植物の全身にサイレンシングの効果を拡大させる (27、33、61、65、90、91、92)。もし、ウイルスゲノム配列情報を持ったサイレンシングシグナルがウイルスの移行より早く植物全身に拡大すれば、植物全身でウイルスに対する塩基配列特異的抵抗性が成立するためウイルスは全身感染できなくなる。一方、ウイルスは植物の RNA サイレncingを回避するため、サイレンシングサプレッサーをコードしている。これまでに 30 種類以上のサイレンシングサプレッサーが同定されているが、これらの間でアミノ酸配列のホモロジーは無い (72、93)。ポチウイルス属の HCPro (2、7、21、40、41)、ククモウイルス属の 2b (7、19、26、108)、トンプスウイルス属の P19 (13、46、87) などが広く研究されており、これらのタンパク質はウイルスの複製および移行には必須では無いが全身感染に必須である。一方、トマトモザイクウイルス (*Tomato mosaic virus* ; ToMV) では 130K の複製タンパク質 (44、45)、PVX では TGB タンパク質のうち P25 (4、94)、*Turnip crinckle virus* (TCV)、*Cowpea mosaic virus* (CPMV) およびカンキツトリステザウイルス (*Citrus tristeza virus* ; CTV) では CP がサイレンシングサプレッサー活性を有することが報告されており (10、15、52、67、84)、ウイルスの複製、粒子形成および細胞間移行において基本的な役割を担うタンパク質自体がサプレッサーとしての活性を持つ。このように植物ウイルスは植物との相互作用によりウイルスタンパク質を多機能に進化させ、サイレンシングサプレッサーのようなウイルス感染をサポートするための機能を獲得したと考えられる。つまり、ウイルスタンパク質

の多機能性の理解は、ウイルスが宿主植物でどのように感染、増殖しているのかを明らかにし、効率的な防除法を考える上で重要な課題である。

本研究で供試したリンゴクロティックリーフスポットウイルス (*Apple chlorotic leaf spot virus* ; ACLSV) はリンゴステムピッティングウイルス (*Apple stem pitting virus* ; ASPV)、リンゴステムグルーピングウイルス (*Apple stem grooving virus* ; ASGV) と共にリンゴ高接病を引き起こす病原ウイルスで、1930年代半ばから1970年代にかけて、わが国のリンゴ栽培に大きな影響を与えたウイルスである (53、54、64、101、106)。高接病になったリンゴ樹は、台木にえそや亀裂が生じ養水分の吸収が妨げられるため、リンゴ樹全体が衰弱し、やがて枯死する。また、地上部の葉が黄化して小さくなり、果実も小型化するため商品価値が著しく低下する。わが国では果樹の品種を更新する際、既存の栽培リンゴ樹に新品種の穂木を接ぎ木する、いわゆる高接ぎが一般的に行われてきた。またリンゴ樹の台木としてマルバカイドウ (*Malus prunifolia* Borkh. var. *ringo*) やミツバカイドウ (*M. sieboldii* Rehd.) などが広く用いられてきた。高接ぎ病は海外から導入されたデリシャス系のリンゴに感染していた病原ウイルスがマルバカイドウやミツバカイドウなどの台木に病原性を示すために、わが国のリンゴ樹に広く発生したとされている (34、99、101)。

ACLSV はリンゴ以外にもモモ、オウトウ、スモモなどのバラ科果樹にも広く感染し、樹種や品種、台木の種類によっては重要な病気を引き起こす。海外では、各種果樹類の重要な病害を引き起こす系統が存在し、例えばアンズ、オウトウ、スモモの果実のえそを伴ったピッティングを引き起こす系統が報告されている (18)。フランスで分離された ACLSV-P (P863) は樹皮亀裂を起こしているスモモから (23)、ドイツではスモモから Plum Pseudopox Strain (PBM1) が (39)、また、Balaton1 (BAL1) はハンガリーで激しいえそ果を引き起こし

ている野生オウトウから分離された株である (24)。わが国では普通系 (P205) とミツバ潜在系 (MO5) など多数の分離株が報告されている。本研究室では、リンゴ輪状さび果病樹から A4 と B6、リンゴ奇形果病樹から分離された GC10a、GC10c、GC10f、GC10h および GC10j を分離し報告した (75、76、83、97、101)。リンゴ輪状さび果病とリンゴ奇形果病と ACLSV の直接的な関連は証明されていないが、わが国の多くの栽培リンゴ樹には ACLSV が潜在的に感染しているため、今後も重要な病害を引き起こす危険性を持っている。

地球温暖化は、今後果樹の品種構成や生育環境に大きな影響を与えると考えられる。それに伴う栽培形態あるいは新品種の導入は ACLSV の増殖能や病原性にも大きな影響を与え、新たな被害をもたらす可能性もある。ACLSV の感染、増殖に関与する遺伝子の機能を解析することは、ACLSV による病害の発生とその防除に対応する上での基礎的知見を提供する。また、果樹類のような永年性の木本植物に適応してきたウイルスの研究はとくに宿主との相互作用において、草本植物を宿主とするウイルスとは異なる知見が得られることが期待できる。

ACLSV はトリコウイルス属のタイプ種で、約 720nm の屈曲性に富んだひも状ウイルスであり、一本鎖の RNA ゲノムと 21 kDa の CP から粒子が形成されている (51、58、102、103)。これまでに日本のリンゴ樹から分離された 4 株 [P205 (ジーンバンクアクセッション番号 : D14996)、MO5 (AB326225)、A4 (AB326223)、B6 (AB326224)] とヨーロッパで分離された 3 株 [P863 (M58152)、PBM1 (AJ243438)、BAL1 (X99752)] の全ゲノム配列が決定されている (23、24、75、76、77、83)。P205 のゲノム RNA は 7552 塩基で、5'末端はキャップ構造、3'末端はポリ A 配列を持つと考えられている。ACLSV ゲノムには 3 つのオープンリーディングフレーム (ORF) が認められ、ORF1 がコードする 216

kDa のタンパク質はメチルトランスフェラーゼ、パパイン様プロテアーゼ、ヘリカーゼ、RNA 依存 RNA ポリメラーゼの共通保存配列を含む複製関連タンパク質、ORF2 は 50 kDa の MP (P50)、ORF3 は CP をコードしている (77、103)。これらのタンパク質は本来の機能が明確に定義されているが、それに加えて ACLSV の感染をサポートするような機能を持つ可能性がある。

本研究では ACLSV のコードするタンパク質の多機能性を検証する目的で、1) ACLSV-CP のアミノ酸変異の解析、2) ACLSV とリンゴ小球形潜在ウイルス (ALSV) の RNA サイレンシングサプレッサーの同定、3) ACLSV-P50 のシステミックサイレンシング抑制メカニズムの解析を行った。なお、本研究の一部はすでに *Journal of General Virology* 88 : 316-324 (2007) 、*Journal of General Virology* 88 : 2611-2618 (2007) および *Archives of Virology* 152 : 1839-1849 (2007) に発表した。

本研究の遂行に当たり、終始暖かい御指導、御教授を下さり、さらに御校閲の労を執られた岩手大学農学部教授吉川信幸博士、岩手大学農学部准教授磯貝雅道博士、弘前大学農学生命科学部教授佐野輝男博士、山形大学農学部教授生井恒雄博士に深く感謝申し上げます。

東北大学農学部教授池上正人博士ならびにカルフォルニア大学デービス校研究員今辰哉博士には各種 Ti プラスミドを分譲して頂いた。大阪府立大学生命環境科学部教授大木理博士ならびに京都府農業資源研究センター研究員故小堀崇博士にはキュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus* ; CMV) の 2b 遺伝子の cDNA クローンを分譲して頂いた。英国ジョンイネス研究所教授 David Baulcombe 博士には GFP 発現 *Nicotiana benthamiana* line16c の種子を分譲して頂いた。岩手大学農学部教授平秀晴博士ならびに岩手大学 RI 総合実験室技術専門職員秋葉文仁氏にはアイソトープ実験の御指導、御教授を賜わった。岩手大学

21 世紀 COE プログラム博士研究員高橋翼博士ならびに岩手大学農学部学術研究員山岸紀子博士には多くの御助言、御協力を頂いた。最後に本研究の遂行と研究室生活に当たっては、同僚各位の御協力と激励によるところが大きい。ここに深く感謝申し上げる。

第2章

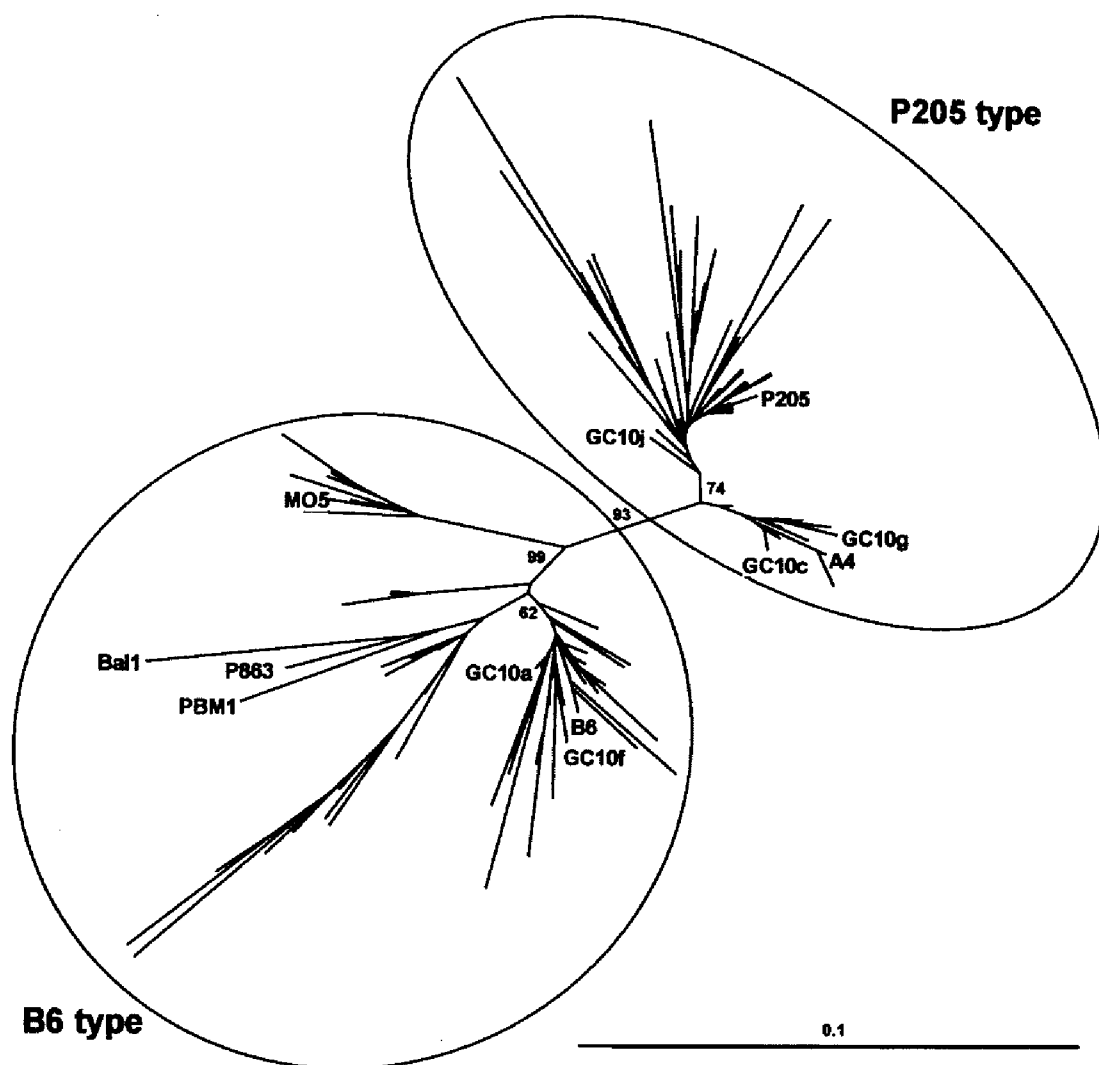
リンゴクロロティックリーフスポットウイルス外被タンパク質 (ACLSV-CP) のアミノ酸変異の解析

わが国のリンゴ樹から分離された ACLSV 分離株 [普通系 (P205 ; 77、101)、リンゴ輪状さび果罹病樹からの分離株 (A4 と B6 ; 83)、ミツバ潜在系 (MO5 ; 75、76、101)、リンゴ奇形果罹病樹からの分離株 (GC10a、GC10c、GC10f、GC10h および GC10j ; 97)]、海外で分離された株 [スモモ系 (P863 と PBS1 ; 23、39)、オウトウ系 (BAL1 ; 24)] およびリンゴ 23 樹から直接増幅した 109 の cDNA クローン (弘前大学、佐野輝男博士からデータを提供して頂いた) の CP アミノ酸配列に基づいた系統解析から、わが国の ACLSV は大きく 2 つのグループに分かれることが明らかとされている (第 1 図 ; 97)。これらの 2 グループ間でアミノ酸配列を比較するとアミノ酸番号 40, 59, 75, 130, 184 の 5 ヶ所のアミノ酸がほぼ全ての分離株で連動して変異しており、特に 40 番と 75 番のアミノ酸の組み合わせ (アラニンとフェニルアラニンまたは セリンとチロシン) が感染性に必須であることが明らかにされた (第 2 図 ; 97)。本研究では、CP の 40 番と 75 番のアミノ酸変異が細胞レベルでのウイルス複製および蓄積にどのように影響するか解析した。

1. 材料と方法

(1) Ti プラスミドを基にした ACLSV 感染性 cDNA クローン (pBICLSF) の構築

本研究室保存の ACLSV 感染性 cDNA クローン (pCLSIF ; 78、79、81) を以



第1図. ACLSV の12分離株と cDNA クローンに含まれる109のCPアミノ酸配列に基づいた ACLSV の系統樹

2つのクラスター (P205 タイプと B6 タイプ) は円で囲んである。系統樹を簡潔に示すため、109のcDNA クローンの名称と細かいブートストラップ値は表示していない。

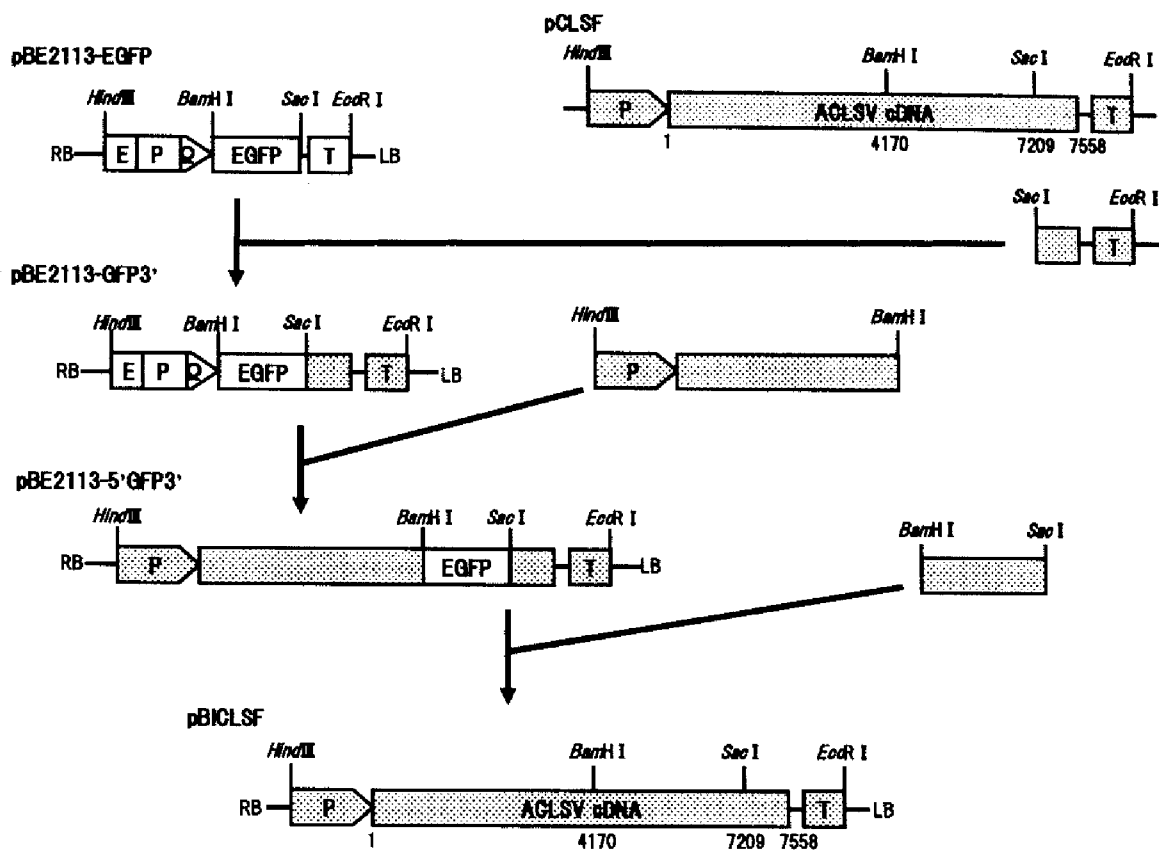
			40		59		75	
			*		*		*	
P205	1	MAAVLNQLKVDADLKAFLAAEGRPLHGKTGAILEQTLEAIFANIAIQGTSEQTEFLDVLVEVKSMEDQKVVGSTFNLKEVVGLIKIFRTTSSDFNISSMT						
A4	1A.....VM.....I..F.....S.....K.....NN..						
GC10c	1E.....A.....VT.....I..F.....S..V...K.....NN..						
GC10h	1A.....VT.....I..F.....N.....K.....NN..						
GC10j	1A.....VQ.....M..F.....N.....K.....						
B6	1I..S.....LM.....I..Y.....NM...AK.....N..						
GC10a	1S.....LS.....I..Y.....NM...AK.....N..						
GC10f	1D-.....S.....L.....LV.....I..Y.....NM...AK.....N..						
MO5	1V.....L..S.....LV.....VN..Y...S..D...K.....NG..						
P863	1S...G..N...T...I..S.....LV.....S..L..Y...N...A..K.....NK..						
BAL1	1K..N...T...I..S...V.....LT.....STL..Y..R...N...A..K.....G..						
PBM1	1G...V...I..S.....LT.....I..Y..R...N...A..KI...Q...NN..						
			130				184	
			*				*	
P205	101	FRQVCEAFAPPEARNGLVKLKYGVTNLFSTMPVEVGKYPELMFDFNKGLNMFIMNKAQKQVITNMNRLLQTEFAKSENEAKSSVTDL CV						
A4	101S.....M.....I						
GC10c	101S.....M.....I						
GC10h	101S...E.....M.....I						
GC10j	101S.....M.....V						
B6	101T...N.....L.....I						
GC10a	101T...S.....L.....I						
GC10f	101T...S.....L.....I						
MO5	101D...T...L.....I						
P863	101T...S.....L...S...I						
BAL1	101T...N..S...I...S...I						
PBM1	101T...S.....P.....L...S...I						

第2図. ACLSV分離株のCPアミノ酸配列の比較

日本のリンゴ樹から分離された9株 [P205 (ジーンバンクアクセッション番号: D14996)、MO5 (AB326225)、A4 (AB326223)、B6 (AB326224)、GC10a (AB326226)、GC10a (AB326226)、GC10c (AB326227)、GC10f (AB326228)、GC10h (AB326229)] とヨーロッパで分離された3株 [P863 (M58152)、PBM1 (AJ243438)、BAL1 (X99752)] のCPアミノ酸配列を比較した。アスタリスクは連動して変異している5箇所のアミノ酸 (40、59、75、130、184番) を示している。P205分離株のアミノ酸配列と異なるアミノ酸のみを表記している。

下の手順で Ti プラスミドベクター (pBE2113-EGFP ; 60) の T-DNA 領域上にクローニングした (第 3 図)

pCLS F を *SacI* と *EcoRI* で切断後、1 %アガロースゲル (0.1 μ g/ml エチジウムブロマイドを含む) で電気泳動した。ノパリンシンターゼ (NOS) 遺伝子のターミネーター配列を含む pCLS F の 3'末端配列を切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社) を用いて回収した。この DNA 断片を同じ制限酵素で切断した pBE2113-EGFP にライゲーションした。ライゲーション反応は DNA Ligation Kit ver2.1 (TAKARA 社) を用いて行った。ライゲーション産物を以下の手順で大腸菌 (DH5 α) に形質転換した。−80℃ で凍結保存しておいた DH5 α を氷上で溶解し、100 μ l の DH5 α に 5 μ l のライゲーション産物を加え、穏やかに攪拌後、氷上に 30 分間静置した。続いて 42℃ で 45 秒間処理し、ただちに氷上で 2 分間急冷した。37℃ で予温しておいた 900 μ l の SOC (20 mg/ml の Tryptone peptone、5 mg/ml の Yeast extract、10 mM NaCl、2.5 mM KCl、10 mM MgCl₂、10 mM MgSO₄ および 10 mM グルコース) を加えて混合し、37℃ で 1 時間振盪培養した。37℃ で予温しておいた 50 μ g/ml のカナマイシンを含む LB 寒天培地 (10 mg/ml の Tryptone peptone、5 mg/ml の Yeast extract、10 mg/ml の NaCl および 15 mg/ml の Agar) に培養液を塗り広げ、37℃ で 14 - 16 時間培養した。LB 寒天培地上に形成した単一の白色コロニーを、滅菌済みの爪楊枝を用いて、50 μ g/ml のカナマイシンを含む 2 ml の 2×YT 液体培地 (16 mg/ml の Tryptone peptone、10 mg/ml の Yeast extract および 5 mg/ml の NaCl) に移し換え、37℃ で 12 - 16 時間振盪培養し、以下のアルカリ法で大腸菌からプラスミド DNA を抽出した。まず培養液を 1.5 ml 容のマイクロチューブに移し、遠心分離 (14000 rpm、1 分間、4℃) し、菌体を沈殿し培地を除去した。沈殿に 200 μ l の懸濁緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH8.0)、10 mM EDTA] を加えて懸濁した後、



第3図. Tiプラスミドを基にした ACLSV-cDNA クローン (pBICLSF) の構築

ボックス内の E はトランスクリプショナルエンハンサー、P は CaMV 35S プロモーター、Ω はトランスレイショナルエンハンサー、T はノパリンシンターゼ遺伝子ターミネーターを示している。

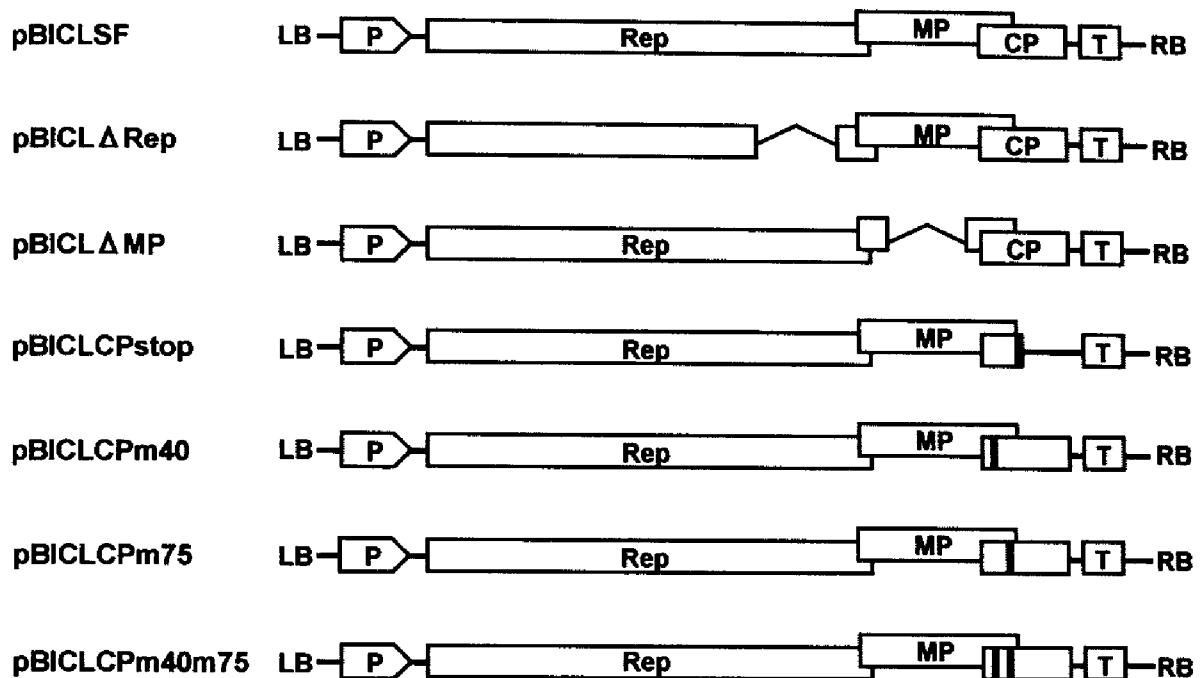
200 μ l のアルカリ緩衝液 [200 mM NaOH、1% SDS (w/v)] を加えて穏やかに攪拌し、室温で 5 分間静置した。氷冷しておいた 200 μ l の 3 M 酢酸カリウム (pH 5.5) と 20 μ l のクロロホルムを加えて混合し、遠心分離 (14000 rpm、10 分間、4°C) した。上清を新しいマイクロチューブ移し、600 μ l のイソプロパノールと 60 μ l の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を加えて攪拌し、遠心分離 (14000 rpm、10 分間、4°C) した。上清を除去し、1 ml の 70% エタノールを加えて遠心分離 (14000 rpm、5 分間、4°C) 後、沈殿を減圧乾燥し、50 μ g/ml の RNaseA を含む TE 緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1mM EDTA] に懸濁した。プラスミドに挿入された DNA は *SacI* と *EcoRI* で切断し、その長さを確認した。得られたプラスミドを pBE2113-GFP3' とした (第 3 図)。

次に pCLSF を *HindIII* と *BamHI* で切断し、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーター配列を含む 5' 末端側断片を同じ制限酵素で切断した pBE2113-GFP3' にライゲーションし、pBI5'GFP3' を作製した (第 3 図)。最後に pCLSF を *BamHI* と *SacI* で切断して得られた DNA 断片 (塩基番号 4171-7208) を同じ制限酵素で切断した pBI5'GFP3' にライゲーションして、ACLSV 全長 cDNA を含む Ti プラスミド (第 3 図) を作製した。このプラスミドを pBICLSF とした。

(2) pBICLSF を基にした変異型 cDNA クローンの作出

ACLSV-RNA がコードする P216、P50 および CP の各遺伝子に変異を導入した 6 つの変異型クローン (pBICL Δ Rep、pBICL Δ MP、pBICLCPstop、pBICLCPm40、pBICLCPm75 および pBICLCPm40m75) を構築した (第 4 図)

1) 複製関連タンパク質 (P216) 遺伝子に欠失を導入した変異型クローン



第4図. pBICLSF を基に構築した ACLSV 変異型クローンの模式図

ボックス内の P は CaMV 35S プロモーター、Rep は 216 KDa の複製関連タンパク質、MP は 50 KDa の細胞間移行タンパク質、CP は外被タンパク質、T はノパリンシンターゼ遺伝子ターミネーターを示している。pBICLCPm40、pBICLCPm75、pBICLCPm40m75 の CP ボックス内の太線は 40 番と 75 番のアミノ酸置換（アラニンからセリン、またはフェニルアラニンからチロシン）を示している。

ACLSV ゲノムの 4152-5727 番に相当する 1576 塩基 (RNA ポリメラーゼの共通保存配列を含む) を欠失させるため、pBICLSF を *Kpn*I で処理し、1 %アガロースゲル (0.1 μ g/ml エチジウムブロマイドを含む) で電気泳動した。ゲルから約 27000bp の DNA 断片を切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社) を用いて回収した。セルフライゲーション後、この DNA を DH5 α に形質転換した。プラスミド抽出は 2-1- (1) の方法で行った。得られたクローンを pBICL Δ Rep とした (第 4 図)。

2) 細胞間移行タンパク質 (P50) 遺伝子および CP 遺伝子に欠失あるいはアミノ酸置換を導入した変異型クローン

本研究室保存の P50 遺伝子の 37 番から 286 番のアミノ酸を欠失させたクローン (p Δ StuNhe ; 80、81)、CP 遺伝子にストップコドンを導入したクローン (pCPstop ; 81) および CP 遺伝子の 40 番のアミノ酸をアラニンからセリンへ、75 番をフェニルアラニンからチロシンに置換したクローン (pCPm40、pCPm75 および pCPm40m75 ; 97) をそれぞれ *Bam*HI と *Xba*I で切断し、目的の DNA 断片を QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社) を用いて回収した。得られた DNA 断片を、同じ制限酵素で切断した pBI5'GFP3'にライゲーションし、得られたクローンをそれぞれ pBICL Δ MP、pBICLCPstop、pBICLCPm40、pBICLCPm75 および pBICLCPm40m75 とした (第 4 図)。

3) 変異型 CP を一過的に発現する Ti プラスミドの作出

CP 遺伝子の 40 番のアミノ酸をアラニンからセリンへ、75 番をフェニルアラニンからチロシンに置換した変異型 CP を CaMV35S プロモーター制御下で一過的に発現する Ti プラスミド (pBE2113-CPm40、-CPm75 および -CPm40m75) を

以下の手順で作製した。pBE2113 ベクターはトランスクリプショナルエンハンサー、CaMV35S プロモーター、トランスレーショナルエンハンサー、クロニングサイト、NOS ターミネーターから構成されている Ti プラスミドベクターである (60)。

pCPm40、pCPm75 および pCPm40m75 を鋳型として polymerase chain reaction (PCR) で CP 遺伝子を増幅した。1 μ l の鋳型 DNA (10 ng) と 2 μ l のプラス鎖プライマー [ACCPBam (+) ; 5'-CGCGGATCCATGGCGGCAGTGCTGAAC-3' (下線部は *Bam*HI 認識配列)] (10 μ M)、2 μ l のマイナス鎖プライマー [ACCP (-) ; 5'-ACTAAACGCAAAGATCAG-3'] (10 μ M)、5 μ l の 10 \times buffer for KOD-Plus-Ver. 2 (TOYOBO 社)、3 μ l の 25 mM MgSO₄、5 μ l の 2 mM dNTPs (TOYOBO 社)、2 μ l の KOD-Plus (1 unit/ μ l; TOYOBO 社) そして 30 μ l の滅菌水を加えて混合し、初め 94 $^{\circ}$ C で 5 分間熱変性し、続いて、94 $^{\circ}$ C 30 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒、68 $^{\circ}$ C 1 分間を 30 サイクル繰り返し、最後に 68 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした。PCR 反応液に等容の TE 飽和フェノール/クロロホルムを加えて、1 分間激しく攪拌した。遠心分離 (14000 rpm、5 分間、4 $^{\circ}$ C) 後、水層を回収し、3 倍容の 99.5% エタノールと 0.1 容の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を加え、遠心分離 (14000 rpm、10 分間、4 $^{\circ}$ C) した。上清を除去し、1 ml の 70% エタノールを加え、遠心分離 (14000 rpm、5 分間、4 $^{\circ}$ C) 後、沈殿を減圧下で乾燥し、滅菌水で懸濁した。この PCR 産物を *Bam*HI と *Sac*I で処理し、同じ制限酵素処理した pBE2113-CP にライゲーションした。変異導入確認後、得られたクローンをそれぞれ pBE2113-CPm40、-CPm75、-CPm40m75 とした (第 5 図)。野生型 CP と MP (P50) を発現する Ti プラスミド (pBE2113-CP、-P50) は本研究室保存のクローンを用いた (第 5 図 ; 105)。CP フレームシフト変異体の作成には CP の開始コドンの 5' 末端側 1 塩基を欠失したプラス鎖プライマー

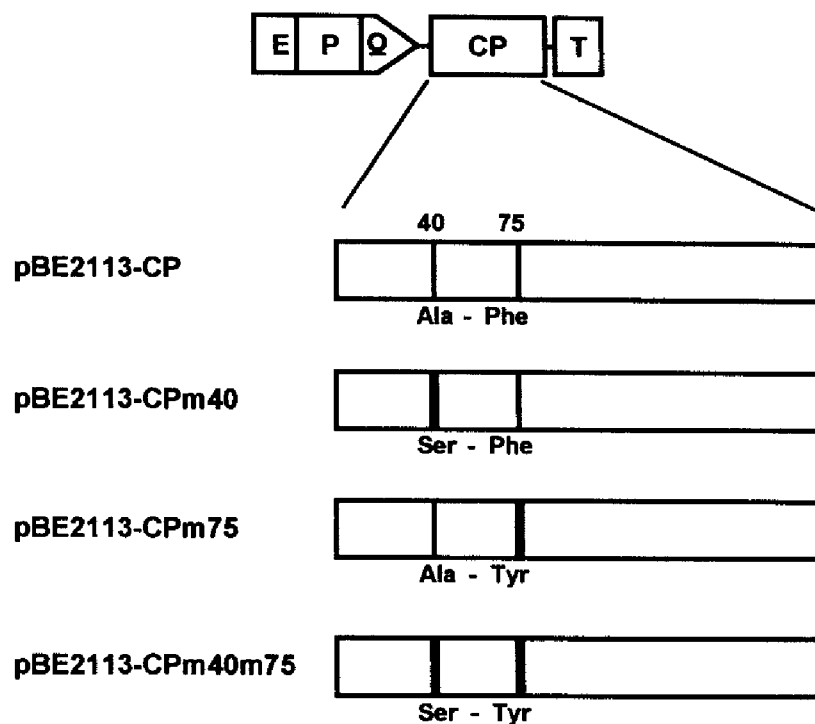
[ACCPFSBam (+) ; 5'-CGCGGATCCTGGCGGCAGTGCTGAACCTC-3' (下線部は *Bam*HI 認識配列)] とマイナス鎖プライマー [ACCP (-)] および pCLSF を鋳型 DNA として用いた PCR で CP 遺伝子にフレームシフト変異を導入した。PCR 産物は *Bam*HI と *Sac*I で処理し、同じ制限酵素処理した pBE2113-CP にライゲーションした。変異導入確認後、得られたクローンを pBE2113-FSCP とした。

コントロールとしてベクター配列のみの Ti プラスミドを構築した。pBE2113-EGFP を *Bam*HI と *Sac*I で処理し、EGFP 配列を除去した後、DNA Blunting kit (TAKARA 社) を用いて平滑末端化し、セルフライゲーションした。得られたクローンを pBE2113-P35T とした。

(4) アグロインフィルトレーション

1) アグロバクテリウムの形質転換

Ti プラスミドのアグロバクテリウム (C58C1) への導入は以下の手順で行った。マイクロチューブに 100 μ l の C58C1 懸濁液と 5-10 μ l の DNA 溶液を加え、穏やかに混合した。液体窒素に 2 分間浸して急速凍結させた後、ただちに 37°C で 5 分間保温した。これに 1 ml の LB 液体培地を加え 28°C で 3 時間振盪培養した後、100 μ g/ml のカナマイシン、100 μ g/ml のリファンピシンおよび 5 μ g/ml のテトラサイクリンを含む LB 寒天培地に培養液を塗り広げ、28°C で 36-48 時間培養した。LB 寒天培地上に形成した単一の白色コロニーを、滅菌済みの爪楊枝を用いて、100 μ g/ml のカナマイシン、100 μ g/ml のリファンピシンおよび 5 μ g/ml のテトラサイクリンを含む 4 ml の LB 液体培地に移し換え、28°C で 18-24 時間振盪培養した。培養液の一部を用いて 2-1- (1) の方法と同様にプラ



第 5 図. 野生型 CP および変異型 CP (CPm40、CPm75、CPm40m75) を一過的に発現する Ti プラスミドの模式図

ボックス内の E はトランスクリプショナルエンハンサー、P は CaMV 35S プロモーター、Q はトランスレイショナルエンハンサー、CP は外被タンパク質、T はノパリンシンターゼ遺伝子ターミネーターを示している。pBE2113-CPm40、-CPm75、-CPm40m75 は 40 番と 75 番のアミノ酸がアラニンまたはフェニルアラニンからチロシンに置換されており、太線で示してある。

スミド DNA 抽出し、目的のプラスミドが導入されていることを確認した。残りの培養液に終濃度が 25%になるようにグリセロールを加えて混合し、グリセロールストックとした。グリセロールストックは実験に用いるまで -80°C で保存した。

2) アグロインフィルトレーション

グリセロールストックから白金耳を用いてアグロバクテリウムを掻き取り、 $100\ \mu\text{g/ml}$ のカナマイシン、 $100\ \mu\text{g/ml}$ のリファンピシンおよび $5\ \mu\text{g/ml}$ のテトラサイクリンを含む LB 寒天培地に塗り広げ、 28°C で 36 - 48 時間培養した。寒天培地上で増殖したアグロバクテリウムを回収し、インフィルトレーション緩衝液 [$10\ \text{mM}$ MES ($\text{pH}5.6$)、 $10\ \text{mM}$ MgCl_2 、 $150\ \mu\text{M}$ アセトシリンゴン]に懸濁した。分光光度計で OD_{600} を測定し、 $\text{OD}_{600}=2.0$ あるいは 1.0 になるように調整した後、 25°C で 3-4 時間静置した。

7-8 葉期の *Nicotiana occidentalis* の展開葉（第 5、6 葉）に $1\ \text{ml}$ 容のニードルレスシリンジでアグロバクテリウム懸濁液を葉の裏から注入（インフィルトレーション）した。二種のアグロバクテリウムを混合してインフィルトレーションする場合はインフィルトレーションする直前に各アグロバクテリウムを等量混合した。インフィルトレーションした個体は、実験に用いるまで 25°C のグローースチャンバーで育成した。

(5) RNA 抽出

1) 全 RNA 抽出

全 RNA 抽出は TRI reagent (Sigma 社) を用いて以下の手順で行った。 -80°C

で凍結した葉組織 0.1 g に 1 ml の TRI-reagent を加え、乳鉢と乳棒で十分に磨砕した。磨砕液をマイクロチューブに移し、200 μ l のクロロホルムを加え、5 分間激しく攪拌した。遠心分離 (14000 rpm、5 分間、4℃) 後、水層を回収し、フェノール/クロロホルム抽出をもう一度行った。得られた水層に等容のイソプロパノールと 0.1 容の 3 M 酢酸ナトリウム(pH 5.2)を加えて攪拌し、室温で 20 分間静置した。遠心分離 (14000 rpm、15 分間、4℃) 後、得られた沈殿に 1 ml の 70% エタノールを加え、再び遠心分離 (14000 rpm、5 分間、4℃) した。沈殿を減圧下で乾燥後、滅菌水で懸濁した。これを全 RNA 溶液とした。

2) 高分子一本鎖 RNA の精製

全 RNA 溶液から低分子 RNA (約 300nt 以下) および二本鎖 RNA を除去するため、全 RNA 溶液に等容の 4 M LiCl を加えて攪拌し、-20℃で 1 時間静置した。遠心分離 (14000 rpm、15 分間、4℃) 後、得られた沈殿に 1 ml の 70% エタノールを加え、再び遠心分離 (14000 rpm、5 分間、4℃) した。沈殿を減圧乾燥し、滅菌水に懸濁した。この RNA 溶液を高分子一本鎖 RNA 試料とした。

3) 二本鎖 RNA の精製

二本鎖 RNA の精製は Isogai ら (1998 ; 36) の方法に従い以下の手順で行った。全 RNA 溶液に等容の 4 M LiCl を加えて攪拌し、-20℃で 1 時間静置した。遠心分離 (14000 rpm、15 分間、4℃) 後、上清を回収し、エタノール沈殿した。沈殿を 800 μ l の STE [50 mM Tris-HCl (pH 7.0)、100 mM NaCl、1 mM EDTA] で懸濁後、200 μ l の 99.5% エタノールと 0.08 g の CC41 セルロースパウダー (Wattman 社) を加えて 30 分間激しく攪拌し、遠心分離 (14000 rpm、1 分間、4℃) 後、上清を除去した。沈殿に 800 μ l の洗浄緩衝液 [50 mM Tris-HCl (7.0)、

100 mM NaCl、1 mM EDTA、15% エタノール] を加えて 5 分間激しく攪拌し、遠心分離 (14000 rpm、1 分間、4℃) 後、上清を除去した。この洗浄操作を 3 回繰り返した後、沈殿に 200 μ l の滅菌水を加えて 5 分間激しく攪拌し、二本鎖 RNA を溶出した。遠心分離 (14000 rpm、1 分間、4℃) 後、上清を回収し、再び 200 μ l の滅菌水で二本鎖 RNA の回収操作を行った。得られた二本鎖 RNA 溶液をエタノール沈殿し、減圧下で乾燥後、滅菌水に懸濁して二本鎖 RNA 試料とした。

(6) ノーザンブロット分析

1) プローブの調整

ACLSV ゲノムの 3' 末端領域 (塩基番号 6888-7552) のプラス鎖およびマイナス鎖 RNA に相補的なジゴキシゲニン (DIG) 標識 RNA プローブを次のように調整した。制限酵素 *EcoRI* または *XbaI* で線状化した pBSKCLSCP (97) を QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社) を用いて回収した。得られた 28 μ l の鋳型 DNA 溶液に 5 μ l の 10 \times DIG RNA Labeling Mix (Roche 社)、10 μ l の 5 \times Transcription buffer (Promega 社)、5 μ l の 100 mM DTT、2 μ l の T3 RNA polymerase または T7 RNA polymerase (20 units/ μ l ; Promega 社) を加えて混合し、37℃で 1 時間インキュベートした。反応終了後 2 μ l の DNase I (10 units/ μ l ; Promega 社) を加えて混合し、37℃で 15 分間インキュベートした。2 μ l の 0.2 M EDTA (pH 8.0) を加えて反応を停止させ、2.5 μ l の 4 M LiCl と 75 μ l の 99.5% エタノールを加えて混合した後、-80℃で 30 分間静置した。遠心分離 (14000 rpm、10 分間、4℃) 後、沈殿に 1 ml の 70% エタノールを加え、再び遠心分離 (14000 rpm、5 分間、4℃) した。得られた沈殿を減圧乾燥し、100 μ l の滅菌水で懸濁した。

2) ノーザンブロット

ノーザンブロットは以下の手順で行った。マイクロチューブに 5 μ l の RNA 試料、2 μ l の 10 \times MOPS 緩衝液 [0.4 M MOPS (pH 7.0)、0.1 M 酢酸ナトリウム、10 mM EDTA]、3 μ l のホルムアルデヒド、10 μ l のホルムアミドを加えて混合後、65 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートし、ただちに 5 分間急冷して RNA を変性させた。この溶液に 2 μ l の 10 \times ローディング緩衝液 [0.25% キシレンシアノール、0.25% ブロモフェノールブルー (BPB)、50% グリセロール] を加え、変性 RNA 試料を調製した。これを 6% ホルムアルデヒドを含む 1% アガロースゲルで電気泳動した (4 $^{\circ}$ C、1-1.5 時間)。泳動用緩衝液には 1 \times MOPS 緩衝液を用いた。泳動終了後、ゲルを 2 \times SSC [0.3 M NaCl、30 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0)] に 10 分間、20 \times SSC に 30 分間浸して平衡化した後、キャピラリートランスファーによりナイロン膜 (Hybond-N+ ; Amersham 社) にブロットを行った。ブロッティング緩衝液には 20 \times SSC を用いた。ブロット後、ナイロン膜を 2 \times SSC で軽く洗い、1 時間ペーパータオル内で風乾した。その後、膜を UV クロスリンカー (Cosmobio 社) で 0.25 Joules の照射量で UV を照射し、RNA を固定した。

ハイブリダイゼーションとシグナルの検出には DIG Northern Starter Kit (Roche 社) と DIG Wash and Block Buffer Set (Roche 社) を用いて推奨プロトコルに従い以下のように行った。ナイロン膜をポリエチレンバッグに入れ、100 cm² 当たり 10ml の DIG Easy Hyb を加え、68 $^{\circ}$ C で 1-3 時間プレハイブリダイゼーションを行った。次に 1 ml の DIG Easy Hyb [100 $^{\circ}$ C、5 分間で熱変性した DIG 標識 RNA プローブ (約 1 μ g) を含む] を加えて 68 $^{\circ}$ C で 12-16 時間ハイブリダイゼーションした。ナイロン膜を取り出し、50 ml の 2 \times SSC、0.1% SDS

で 10 分間 (3 回、室温) 洗浄後、50 ml の 0.1×SSC, 0.1% SDS で 20 分間 (3 回、68℃) 洗浄した。50 ml の 1×Washing buffer で 5 分間、室温で洗浄後、50ml の 1×Blocking solution (10×Blocking solution を 1×Maleic acid buffer で希釈したもの) で 1 時間、室温でインキュベートした。次に、50ml の Antibody solution [1×Blocking solution で Anti-digoxigenin-AP conjugate (750 U/ml) を 10000 倍希釈したもの] で 1 時間、室温でインキュベートした。膜を 50 ml の 1×Washing buffer で 20 分間 (3 回、室温) 洗浄した後、50 ml の 1×Detection buffer で 5 分間、室温でインキュベートした。ナイロン膜をサランラップの上に移し 2 ml の発光基質 (CDP-Star detection reagent ; Amersham 社) で 5 分間、室温でインキュベートした後、Biomax Light film (Kodak 社) へ露光した。

(7) イムノブロット分析

葉組織の生重量当たり 2 倍量の磨砕緩衝液 [0.1 M Tris-HCl (pH 8.0)、0.1 M NaCl、0.01 M EDTA] を加え、乳鉢と乳棒で磨砕した後、マイクロチューブに移し、等量の 2×サンプル緩衝液 [0.1 M Tris-HCl (pH 8.8)、4% SDS、4% メルカプトエタノール、30% スクロース、0.05% BPB] を加え、十分に攪拌した後、100℃ 5 分間処理した。遠心分離(14000 rpm、5 分間、4℃)後、上清を回収し、タンパク質泳動試料とした。泳動には Tris-glycine 緩衝液 (pH 8.3 ; 0.6% トリス、2.8% グリシン、0.1% SDS) を用い、SDS - 12.5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動 (120 V 定電圧) 後、セミドライエレクトロブロッティング (ATTO 社) によって PVDF 膜 (Millipore 社) に転写した。転写緩衝液には 0.1 M Tris-HCl、0.192 M グリシン、20% メタノールを用いた。転写膜はブロッキング液 [0.02 M Tris-HCl (pH 7.5)、0.5 M NaCl、2% Tween - 20、2% スキムミ

ルク、2% ポリビニルピロリドン] に 60 分間浸した後、TTBS [0.02 M Tris-HCl (pH 7.5)、0.5 M NaCl、2% Tween - 20] で洗浄した (5 分間、4 回)。その後、TTBS で 1000 倍に希釈した一次抗体(ACLSV 抗血清または P50 抗血清)で反応させた (37°C、30 分間)。TTBS で PVDF 膜を洗浄 (5 分間、4 回) した後、3000 倍に希釈した 2 次抗体(アルカリフォスファターゼ標識 抗ウサギ免疫グロブリン-ヤギ血清) で反応させた (37°C、30 min)。さらに、TTBS で洗浄 (5 分間、4 回) した後、発色基質液 [0.2 M Tris-HCl (pH 8.2)、6 mg/ml Fast Red TR salt、1 mg/ml naphthol AS - MIX phosphate] を用いて検出した。十分に発色した後、蒸留水で洗浄し、反応を停止した。

2. 結果

(1) 変異型 cDNA クローンをアグロインフィルトレーションした葉組織からのウイルスゲノム RNA の検出

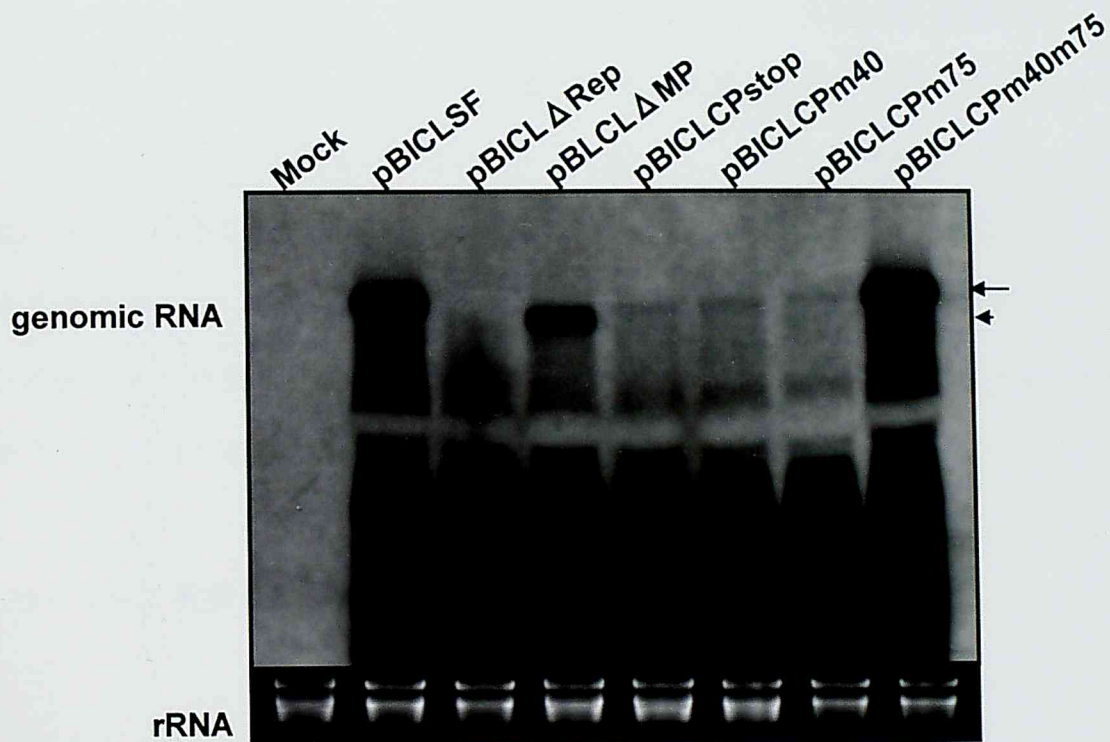
ACLSV 感染性 cDNA クローン (pCLSF) を用いた部位特異的突然変異体解析から、CP の 40 番と 75 番のアミノ酸の組み合わせ (アラニン とフェニルアラニン または セリン とチロシン) が *C. quinoa* と *N. occidentalis* への感染に必須であることが示された (97)。本研究では CP の 40 番と 75 番のアミノ酸置換で感染性が消失した変異体に着目し、これらの変異体が細胞でのウイルス増殖と細胞間移行のどちらが阻害されるか解析した。

変異体の単細胞での増殖能を調べる方法として、アグロバクテリウムを介した接種法 (アグロインフィルトレーション) を利用した。この接種法は、ウイルス感染性 cDNA クローンがクローニングされた Ti プラスミドを持つアグロバ

クテリウム懸濁液を展開葉にインフィルトレーションすることで、インフィルトレーションした組織の多数の細胞にウイルス cDNA を導入することができる。その結果、同調したウイルス感染が誘導され、細胞間移行能とは独立して細胞レベルでの増殖能を調べる事が可能となる (14、22、25、94)。まず、Ti プラスミドの T-DNA 領域に CaMV35S プロモーターに連結した ACLSV 感染性 cDNA クローン(pBICLSF)を構築し、草本宿主での感染性を調べた。pBICLSF を含むアグロバクテリウム (以下クローン名で示す) 懸濁液を *N. occidentalis* の展開葉にインフィルトレーションし、7 日後の葉組織を用いてイムノブロット分析を行い CP の蓄積を調べたところ、全ての接種個体で CP のシグナルが検出された。また、接種個体での病徴は、野生型ウイルス (P205 分離株) を機械的接種した植物のものと同様であった。以上の結果から、pBICLSF はアグロインフィルトレーション法により P205 分離株の機械的接種と同等かそれ以上の感染効率で接種できることが示された。

pBICLSF を基に CP の 40 番と 75 番にアミノ酸変異を導入したクローン (pBICLCPm40, pBICLCPm75, pBICLCPm40m75) を作出した (第 4 図)。比較対照として、複製関連タンパク質の一部に欠失変異を導入し複製能を消失させた変異体 (pBICL Δ Rep)、細胞間移行タンパク質の一部を欠失し細胞間移行能を消失させた変異体 (pBICL Δ MP) および CP 遺伝子コード領域にストップコドンが導入されるように塩基置換を導入し完全長の CP タンパク質を発現できないようにした変異体 (pBICLCPstop) も構築した (第 4 図)。これらの変異体をアグロインフィルトレーション法で *N. occidentalis* に接種し、インフィルトレーション後 3 日目にインフィルトレーションした葉組織から高分子一本鎖 RNA を抽出し、ノーザンブロット分析でウイルスゲノム RNA 蓄積レベルを解析した。

pBICLSF と pBICL Δ MP をインフィルトレーションした葉組織では、ほぼ同



第 6 図. ノーザンブロット分析による pBICLSF および変異型 cDNA クローンをインフィルトレーションした *N. occidentalis* の葉組織からのウイルスゲノム RNA の検出

各 cDNA クローンまたはインフィルトレーション緩衝液のみ (mock) をインフィルトレーション後 3 日目の葉組織から抽出した高分子一本鎖 RNA を試料として用いた。矢印または矢じり形の印は、それぞれ pBICLSF または pBICLΔMP 由来のゲノム RNA の位置を示している。リボソーム RNA (rRNA) のエチジウムブロマイド染色像をローディングコントロールとして示した。

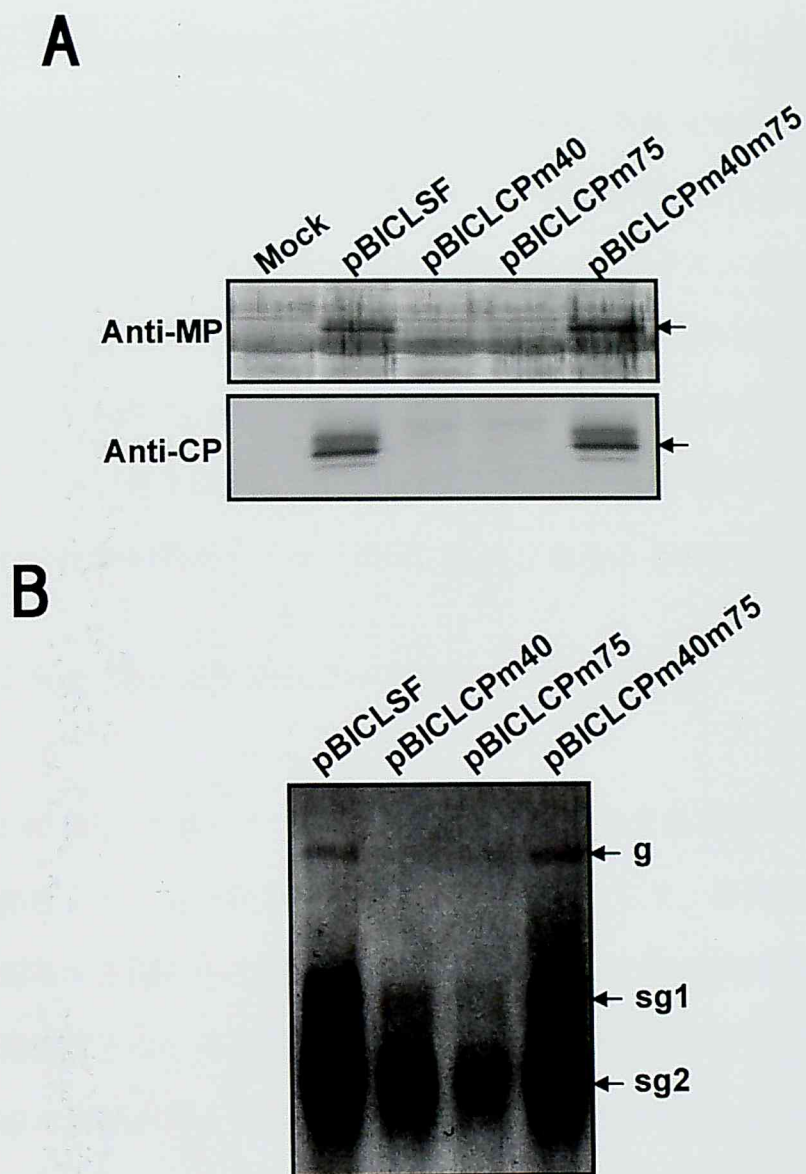
レベルでウイルスゲノムの蓄積が検出されたが、pBICLΔRep ではその蓄積はほとんど検出されなかった（第6図）。この結果から、本実験系は ACLSV の増殖能を細胞レベルで調べる事が可能であると考えられた。pBICLSF および pBICLΔMP のゲノム RNA 蓄積レベルと比較して、pBICLCPm40m75 のそれは同レベルで蓄積したのに対し、pBICLCPstop、pBICLCPm40 および pBICLCPm75 はその蓄積が著しく低下していた（第6図）。以上の結果より、CP 変異クローンの感染性の消失は、細胞間移行より以前の細胞での増殖が阻害されているのが主な原因であると考えられた。

(2) CP 変異型 cDNA クローンの植物細胞での複製能

ウイルスの単細胞での増殖はゲノム RNA の複製、ウイルスタンパク質の合成、ウイルス粒子の蓄積から成り立っている。単細胞での増殖が抑制され、感染性が消失した CP 変異型クローン（pBICLCPm40 と pBICLCPm75）に複製能があるか明らかにする目的で、pBICLSF、pBICLCPm40、pBICLCPm75 および pBICLCPm40m75 をインフィルトレーションした葉組織でのウイルスタンパク質（MP および CP）とウイルスの複製中間体である二本鎖 RNA の蓄積レベルを解析した。

インフィルトレーション後3日目に、全タンパク質を抽出し、イムノブロット分析で MP および CP の蓄積レベルを調べた。その結果、pBICLSF と pBICLCPm40m75 では MP、CP とともに同レベルで蓄積していたのに対し、pBICLCPm40 と pBICLCPm75 ではそれらの蓄積はほとんど検出されなかった（第7図A）。

ACLSV を含む一本鎖 RNA をゲノムとするウイルスにおいて、ウイルスゲノ



第7図. pBICLSF および CP 変異型 cDNA クローンをインフィルトレーションした *N. occidentalis* の3日目の葉組織からのウイルスタンパク質およびウイルス二本鎖 RNA の検出

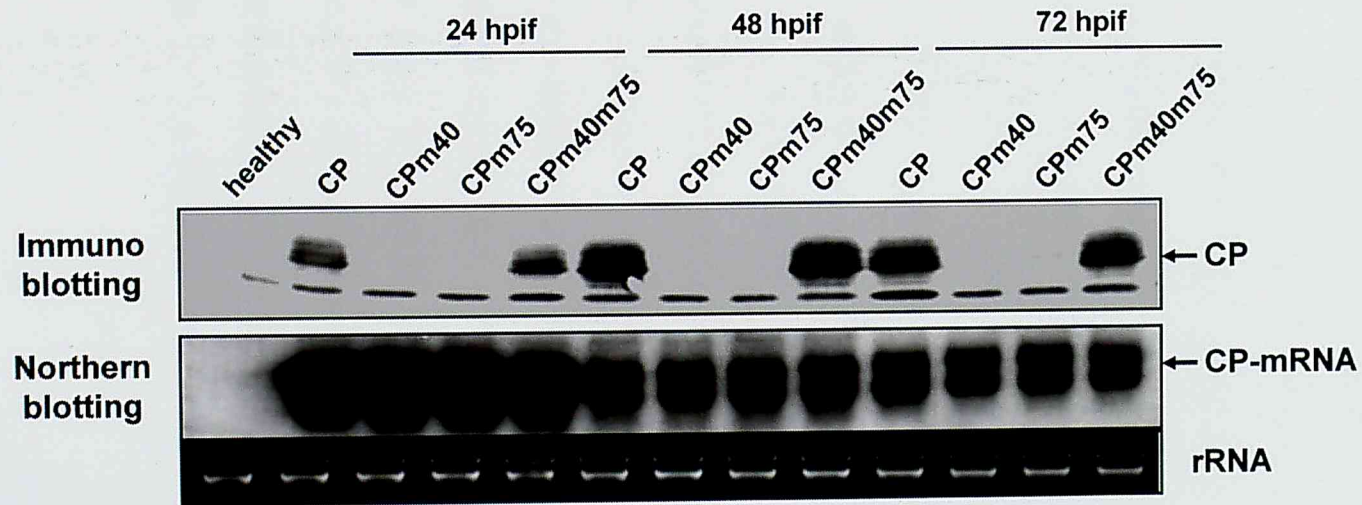
- A : P50 (MP) または CP に対する高血清を用いたイムノブロット分析
矢印は、それぞれ MP または CP タンパク質の位置を示している。
- B : ACLSV ゲノムのマイナス鎖を特異的に検出する RNA プローブによる二本鎖 RNA のノーザンブロット分析。
矢印はゲノム RNA、サブゲノム RNA1 または 2 の位置を示している。

ム由来二本鎖 RNA の蓄積は、ウイルスが複製していることを示す指標となる。インフィルトレーション後 3 日目の葉組織から二本鎖 RNA を抽出し、マイナス鎖を特異的に検出するプローブを用いてノーザンブロット分析を行ったところ、pBICLSF と pBICLCPm40m75 では同レベルでウイルスゲノム全長 RNA、MP を発現するサブゲノム RNA1 および CP を発現するサブゲノム RNA2 が蓄積していたのに対し、pBICLCPm40 と pBICLCPm75 ではそれらの蓄積が著しく低下していた（第 7 図 B）。以上の結果より、CP の 40 番と 75 番のアミノ酸の組み合わせは効率的なウイルス複製に重要であることが示された。

(3) 変異型 CP の植物細胞での安定性

CP の 40 番と 75 番のアミノ酸の一方のみに置換変異を導入すると、ウイルス複製能が低下し、感染性が消失する。この理由として、変異導入された CP は複製に関与する何らかの機能が失われたか、あるいは植物細胞内での安定性が低下し蓄積できないために、結果としてウイルス複製をサポートできないという 2 つの可能性が考えられた。そこで、野生型 CP (CP) と変異型 CP (CPm40、CPm75 および CPm40m75) を一過的に発現する Ti プラスミドコンストラクト（第 5 図）をアグロインフィルトレーションし、植物細胞での CP タンパク質および CP-mRNA 蓄積レベルを経時的に分析した。

pBE2113-CP、-CPm40、-CPm75 および-CPm40m75 を *N. occidentalis* の展開葉にインフィルトレーションし、24 時間、48 時間、72 時間後にイムノブロット分析で CP の蓄積レベルを調べた。その結果、CP および CPm40m75 は 24 時間から検出され、48、72 時間でも蓄積していたのに対し、CPm40 と CPm75 の蓄積はいずれの時間においてもほとんど検出されなかった（第 8 図）。続いて、ノ



第8図. 野生型 (CP) および変異型CP (CPm40、CPm75、CPm40m75) の *N. occidentalis* での安定性

野生型および変異型CPを *N. occidentalis* にアグロインフィルトレーション後24、48、72時間 (hpif) の葉組織を用いた。CPタンパク質およびCP-mRNAの蓄積レベルはそれぞれイムノブロット分析 (上段) またはノーザンブロット分析 (下段) で調べた。矢印はそれぞれCPタンパク質またはCP-mRNAの位置を示している。リボソームRNA (rRNA) のエチジウムブロマイド染色像をローディングコントロールとして示した。

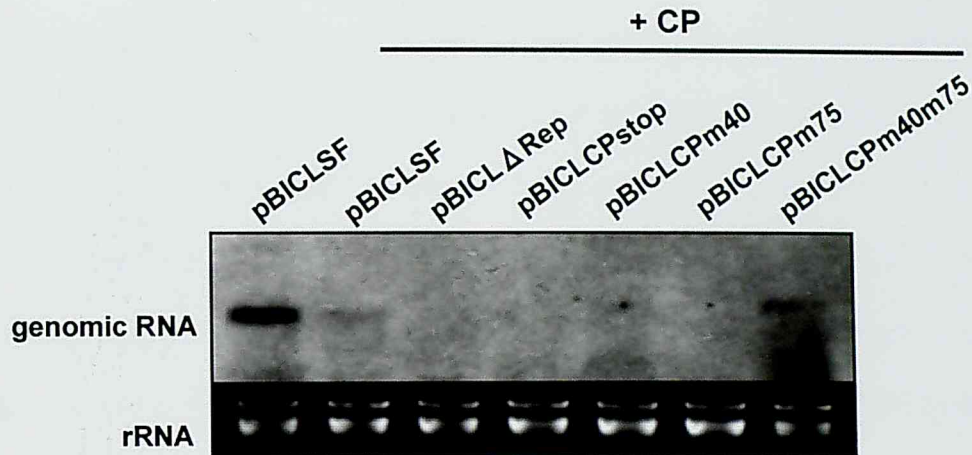
ノーザンブロット分析で CP-mRNA の蓄積レベルを調べたところ、pBE2113-CP、CPm40、-CPm75 および-CPm40m75 をインフィルトレーションした組織で、いずれの時間においても mRNA の蓄積レベルにはほとんど差が認められなかった（第 8 図）。以上の結果より、CP の 40 番と 75 番のアミノ酸の組み合わせは CP タンパク質の安定性に重要であることが示された。

野生型 CP の蓄積が pBICLCPm40 および pBICLCPm75 の複製能の低下を相補するか解析するため、野生型 CP を一過的に発現する Ti プラスミドコンストラクト（pBE2113-CP）と pBICLSF、pBICL Δ Rep、pBICLCPstop、pBICLCPm40、pBICLCPm75 および pBICLCPm40m75（第 4 図）をアグロインフィルトレーションで共発現させた。インフィルトレーション後 3 日目にノーザンブロット分析でゲノム RNA の蓄積レベルを解析した。その結果、pBICLCPstop、pBICLCPm40 および pBICLCPm75 のゲノム RNA の蓄積は相補されず、そればかりでなく pBICLSF および pBICLCPm40m75 の蓄積も阻害された（第 9 図 A）。この CP の一過性発現が pBICLSF の増殖を抑制する現象が、CP タンパク質特異的に起こるのか調べるため、vector、CP のフレームシフト変異体（FSCP）および MP（P50）を pBICLSF と共発現させたところ、CP タンパク質を発現する場合でのみゲノム RNA 蓄積が抑制された（第 9 図 B）。これらの結果は、CP はその発現量あるいは発現するタイミングによってはウイルス複製に対して阻害的に働くことを示唆している。

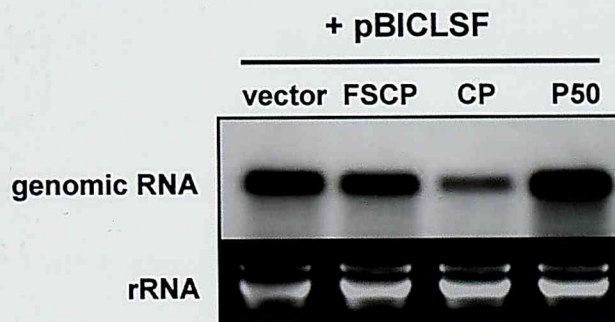
3. 考察

わが国のリンゴに感染している ACLSV は CP アミノ酸配列に基づいた系統解析

A



B



第9図. CPの一過性発現による pBICLSF および各変異型 cDNA クローン由来のゲノム RNA 蓄積阻害

A: CP と各変異型 cDNA クローンをアグロインフィルトレーション後 3 日目にインフィルトレーションした葉組織から抽出した RNA のノーザンブロット分析

B: pBICLSF と各 Ti プラスミドコンストラクトをアグロインフィルトレーション後 3 日目にインフィルトレーションした葉組織から抽出した RNA のノーザンブロット分析

リボソーム RNA (rRNA) のエチジウムブロマイド染色像をローディングコントロールとして示した。

で2つのタイプ(P205タイプとB6タイプ)に区別される(第1図;97)。また、2つのタイプ間で40、59、75、130および184番の5箇所のアミノ酸は連動して変異している(第2図;97)。この5箇所のアミノ酸の部位特異的突然変異体解析では、40番と75番の組み合わせ(アラニンとフェニルアラニンまたはセリンとチロシン)が草本宿主に対する感染性に重要であることが明らかにされている(97)。本研究ではCPの40番と75番のアミノ酸の組み合わせがACLSVの感染にどのように関与しているのか明らかにするため、感染性の消失した変異体を用いたアグロインフィルトレーション法で各変異体の複製能およびCPの安定性を解析した。

CPの40番と75番のアミノ酸をそれぞれ一方のみにアミノ酸置換(アラニンからセリンまたはチロシンからフェニルアラニン)した変異体(pBICLCPm40およびpBICLCPm75)ではウイルスゲノムRNA、二本鎖RNAおよびウイルスタンパク質(MPとCP)の蓄積が著しく低下したのに対し、40番と75番両方のアミノ酸を置換した変異体(pBICLCPm40m75)は野生型(pBICLSF)のそれらと同レベルであり(第6、7図)、CPの40番と75番のアミノ酸の組み合わせは効率的なウイルス複製に重要であると考えられた。この考えは、40番と75番の2箇所のアミノ酸の組み合わせが12のACLSV分離株およびリンゴ樹から直接RT-PCRで増幅したcDNAクローンにおいてもどちらかのタイプに保存されているという結果からも支持される。つまり、この2箇所のアミノ酸の組み合わせはACLSVの自然界での宿主である果樹類においても増殖に必須であることを強く示唆している。なぜ、2つのタイプが存在するかは明らかではないが、リンゴに感染しているACLSVではP205タイプとB6タイプのどちらも見出されるが、モモ、スモモ、アンズやオウトウなどの核果類に感染しているACLSVではB6タイプのみが見出されている(1)。もしかしたら、2つのアミ

ノ酸のタイプは宿主適応に関与するのかもしれない。カルモウイルス属の *Hibiscus chlorotic ringspot virus* と *Pelargonium flower break virus* では *C. quinoa* で継代接種により CP の 8 または 5 箇所のアミノ酸が子孫ウイルスで変異することが報告されている (50、69)。さらに、これらのアミノ酸変異はランダムに起きるわけではなく、宿主適応あるいは加速された遺伝的浮動による現象であることが示唆されている (50)。

変異型 CP タンパク質 (CPm40、CPm75 および CPm40m75) の *N. occidentalis* に対するアグロインフィльтраーションによる一過性発現試験では、CP の 40 番と 75 番のアミノ酸の組み合わせは CP タンパク質の *N. occidentalis* での安定性に影響することが明らかとなった (第 8 図)。この結果から CP 変異型 cDNA クローン (pBICLCPm40、pBICLCPm75) の感染性の消失は、変異型 CP タンパク質が合成されても植物細胞内で安定に蓄積しないため、粒子形成および複製を効率的に行うことができず、単細胞での増殖が抑制されるのが原因と考えられた。つまり、ACLSV の効率的な複製には CP の蓄積が必要であることを強く示唆している。しかしながら、pBICLCPm40 または pBICLCPm75 と野生型 CP を一過的に発現する Ti プラスミドコンストラクト (pBE2113-CP) をアグロインフィльтраーションで共発現させた相補試験を行ったところ、pBICLCPm40 および pBICLCPm75 の複製は相補されず、そればかりでなく野生型 cDNA クローン (pBICLSF) の複製が阻害された (第 9 図)。この結果は、CP はその発現量あるいは発現のタイミングによってはウイルス複製に対して阻害的に働くことを示唆している。

植物ウイルスにおいて CP がウイルス複製に関与する例はわずかであり、アルファモウイルス属のアルファモザイクウイルス (*Alfalfa mosaic virus*; AMV) およびイラルウイルス属で報告されているのみである (5)。これらのウ

ウイルスは、ゲノム RNA に加えてわずかな CP タンパク質あるいは CP サブゲノム RNA が感染に必要で (6)、CP がゲノム RNA の 3'末端非翻訳領域に結合することがウイルス複製に必須である (28、43、63)。ACLSV-CP の複製における機能は明らかではないが、CP とウイルスゲノム RNA との相互作用が効率的な複製に重要なのかかもしれない。

第3章

ACLSV とリンゴ小球形潜在ウイルス(ALSV)の RNA サイレンシングサプレッサーの同定

RNA サイレンシングは真核生物に普遍的に認められる塩基配列特異的な RNA 分解機構である。植物においてはウイルスやトランスポゾンに対する抵抗性機構さらには発生制御にも重要な役割を果たしている。一方で、ウイルスは RNA サイレンシングを抑制するサイレンシングサプレッサーをコードしている。これまでに 30 種類以上のサイレンシングサプレッサーが同定されているが、それらの間でアミノ酸配列のホモロジーはほとんど無く、作用機構も多様である(72、89)。本研究では、ACLSV とリンゴ小球形潜在ウイルス (*Apple latent spherical virus*; ALSV) ALSV のゲノムにコードされるどの遺伝子にサイレンシングサプレッサー活性があるか解析した。

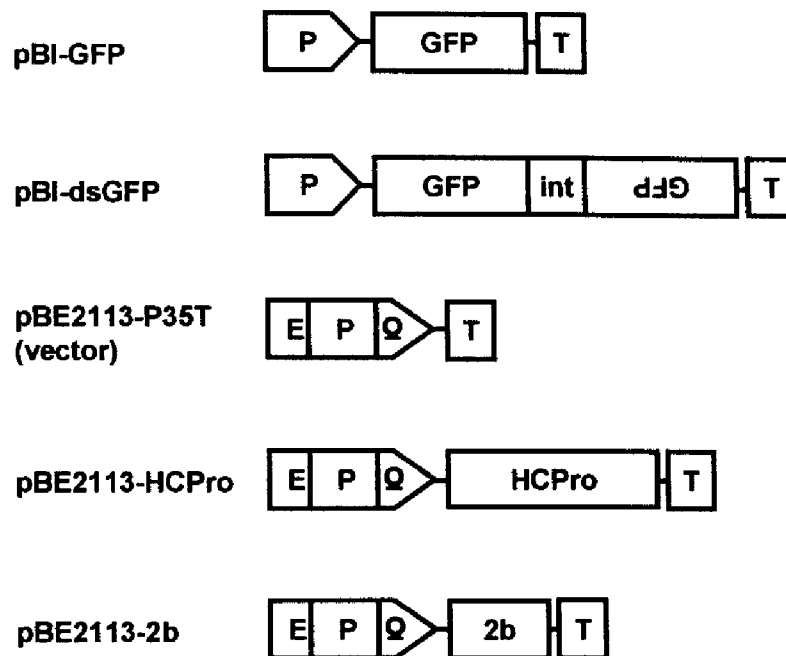
1. 材料と方法

(1) アグロインフィльтраーションアッセイに用いた Ti プラスミド

サイレンシングサプレッサー活性を調べるために以下の Ti プラスミドを用いた (第 10-12 図)。

1) GFP 遺伝子を発現する Ti プラスミド

mGFP5 遺伝子および同遺伝子の二本鎖 RNA 配列を発現する Ti プラスミド (pBI-GFP と pBI-dsGFP ; 第 10 図) は池上正人博士 (東北大学農学部) と



第 10 図. アグロインフィルトレーションアッセイに用いた GFP 遺伝子およびサイレンシングサプレッサーを一過的に発現する Ti プラスミドコンストラクトの模式図

pBI-GFP : mGFP 遺伝子を発現する
 pBI-dsGFP : mGFP 遺伝子の二本鎖 RNA が生成される
 pBE2113-P35T : ベクター配列のみ
 pBE2113-HCPro : CIYVV の HCPro タンパク質を発現する
 pBE2113-2b : CMV (pepo 系統) の 2b タンパク質を発現する

ボックス内の E はトランスクリプショナルエンハンサー、P は CaMV 35S プロモーター、Q はトランスレイショナルエンハンサー、T はノバリンシンターゼ遺伝子ターミネーターを示している。

今辰也博士（現カリフォルニア大学デービス校）に分譲して頂いた。

2) ポチウイルスとククモウイルスのサプレッサーを発現する Ti プラスミド

ポチウイルス属ウイルスの HC-Pro 遺伝子、およびククモウイルス属ウイルスの 2b 遺伝子は RNA サイレンシングサプレッサーとして機能することが報告されている (2, 7)。この 2 種の遺伝子をポジティブコントロールとして用いるため、これらが発現する Ti プラスミドを以下の手順で作製した。

HCPro 遺伝子をクローニングするため、本研究室保存のクローバー葉脈黄化ウイルス (*Clover yellow vein virus* ; CIYVV) (70) 感染 *Chenopodium quinoa* 葉から 2 - 1. - (5) の方法で RNA 抽出し、逆転写 PCR を以下の手順で行った。0.2 ml 容の PCR チューブに 2.25 μ l の RNA 溶液と 1 μ l の Oligo(dT)₁₂ プライマー (10 μ M) を加えて混合し、94°C で 2 分間熱変性した後、氷中で急冷した。これに 2 μ l の 5 \times RT buffer (TOYOBO 社)、1 μ l の 10 mM dNTPs Mixture (TAKARA 社)、0.5 μ l の M-MLV Reverse Transcriptase (100 units/ μ l ; TOYOBO 社)、そして 3.75 μ l の滅菌水を加えて混合し、42°C で 1 時間、94°C で 5 分間インキュベートし、cDNA を合成した。続いて、得られた cDNA を鋳型として以下の条件で PCR を行なった。5 μ l の cDNA 溶液、プラス鎖プライマー [CLHCPro (+) ; 5'-CAGCAACTGAGTAGGATAAG-3']、マイナス鎖プライマー [CLHCPro (-) ; 5'-TATCACCTGCCCTGTCAATG-3'] (10 μ M)、5 μ l の 10 \times Ex Taq Buffer (TAKARA 社)、10 μ l の 10 mM dNTP Mixture (TAKARA 社)、1 μ l の Ex Taq DNA polymerase (5 units/ μ l ; TAKARA 社) そして 25 μ l の滅菌水を加えて混合し、初め 94°C で 5 分間熱変性し、続いて、94°C 30 秒、52°C 30 秒、72°C 1 分間を 30 サイクル繰り返し、最後に 72°C で 10 分間インキュベートした。PCR 産物は pGEM-T Easy Vector System (Promega 社) を用いて TA クローニングした。得られたクローン

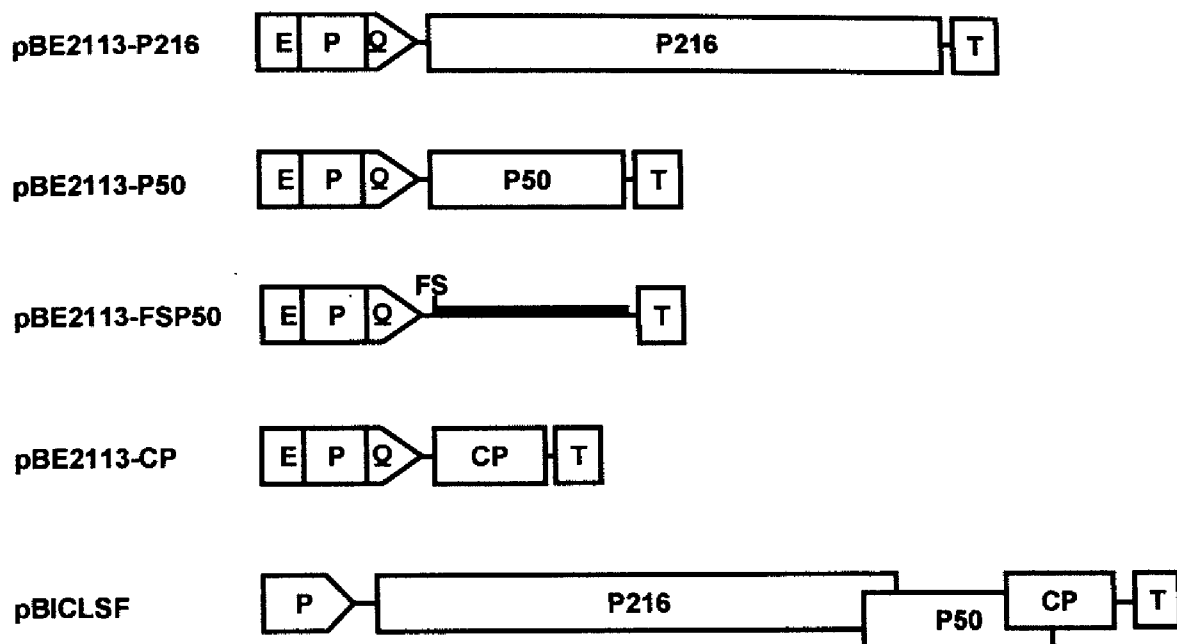
を pGEM-HCPro とした。

pGEM-HCPro を鋳型として、プラス鎖プライマー [ClHCProBam (+) ; 5'-CGCGGATCCATGTCTGCAGGAGATTTGTTT-3' (下線部は *Bam*HI 認識配列)] と マイナス鎖プライマー [ClHCProSac (-) ; 5'-TACATGAGCTCTCAACCAACTCTGTAAAA-3' (下線部は *Sac*I 認識配列)] を用いた PCR で HCPro 遺伝子を増幅した。

キュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus* ; CMV) pepo 系統の 2b 遺伝子 (CMV-2b ; 42、73、74) がクローニングされた pBKP2b [大木理博士 (大阪府立大学生命環境科学部) と小堀崇博士 (京都府農業資源研究センター) より分譲] を鋳型として、プラス鎖プライマー [Pepo2bBam (+) ; 5'-CGCGGATCCATGGAATTGAACGTAGGT-3' (下線部は *Bam*HI 認識配列)] と マイナス鎖プライマー [Pepo2bSac (-) ; 5'-TACATGAGCTCTCAGAAAGCACCTTCCG-3' (下線部は *Sac*I 認識配列)] を用いた PCR で CMV-2b 遺伝子を増幅した。PCR 反応は 2-1- (3) に記載した方法で行った。各 PCR 産物は *Bam*HI と *Sac*I で処理し、同じ制限酵素処理した pBE2113-EGFP にライゲーションした。得られたクローンをそれぞれ pBE2113-HCPro、pBE2113-2b (第 10 図) とした。ネガティブコントロールとしてベクター配列のみの pBE2113-P35T を用いた (第 10 図)。

3) ACLSV ゲノムにコードされる遺伝子を一過的に発現する Ti プラスミド

細胞間移行タンパク質 (P50) 遺伝子および CP 遺伝子を一過的に発現する Ti プラスミド (pBE2113-P50 および-CP) は本研究室保存のクローンを用いた (第 10 図 ; 105)。複製関連タンパク質 (P216) 遺伝子、P50 の開始コドンを欠失したフレームシフト変異体は以下の手順で作製した。P216 遺伝子の PCR に



第 11 図. ACLSV 遺伝子を一過的に発現する Ti プラスミドコンストラクトの
模式図

pBE2113-P216 : 複製関連タンパク質 (P216) を発現する
 pBE2113-P50 : 細胞間移行タンパク質 (P50) を発現する
 pBE2113-FSP50 : フレームシフト変異導入しているため P50 は
 発現されない
 pBE2113-CP : 外被タンパク質 (CP) を発現する
 pBICLSF : ACLSV 感染性 cDNA クローン

ボックス内の E はトランスクリプショナルエンハンサー、P は CaMV
 35S プロモーター、Ω はトランスレイショナルエンハンサー、T はノパ
 リンシンターゼ遺伝子ターミネーターを示している。

よる増幅は pCLSf を鋳型として Expand Long Template PCR System (Roche 社) を用いて行った。1 μ l の鋳型 DNA (100 ng) と 2 μ l のプラス鎖プライマー [ACORF1Xba (+) ; 5'-GCTCTAGAATGGCTTTCTCTCTTATAGA-3' (下線部は XbaI 認識配列)]、2 μ l のマイナス鎖プライマー [ACORF1Sac (-) ; 5'-TACATGAGCTCTCAGAATAAATTCTGGAGCT-3' (下線部は SacI 認識配列)]、5 μ l の 10 \times Expand long template buffer 1、5 μ l の 10 mM dNTPs Mixture、1 μ l の Expand Long Template enzyme mix そして 34 μ l の滅菌水を加えて混合し、初め 94 $^{\circ}$ C で 5 分間熱変性し、続いて、94 $^{\circ}$ C 30 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒、68 $^{\circ}$ C 5 分間を 30 サイクル繰り返し、最後に 68 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした。PCR 反応液をフェノール/クロロホルム抽出後、エタノール沈殿し、滅菌水で懸濁した。この PCR 産物を XbaI と SacI で処理し、同じ制限酵素処理した pBE2113-EGFP にライゲーションした。得られたクローンを pBE2113-P216 とした (第 11 図)。

P50 フレームシフト変異体の作成には P50 の開始コドンを含む 5' 末端側 5 塩基を欠失したプラス鎖プライマー [AC50kFSBam (+) ; 5'-CGCGGATCCGATAAGGGGTCACAAATTGA-3' (下線部は BamHI 認識配列)] と マイナス鎖プライマー [AC50kSac (-) ; 5'-TACATGAGCTCTCACACACTTGGCGGAAGGT-3' (下線部は SacI 認識配列)] および pCLSf を鋳型 DNA として用いた PCR で P50 遺伝子にフレームシフト変異を導入した。PCR 反応は 2-1-(3) に記載した方法で行った。PCR 産物は BamHI と SacI で処理し、同じ制限酵素処理した pBE2113-EGFP にライゲーションした。得られたクローンを pBE2113-FSP50 とした (第 11 図)。

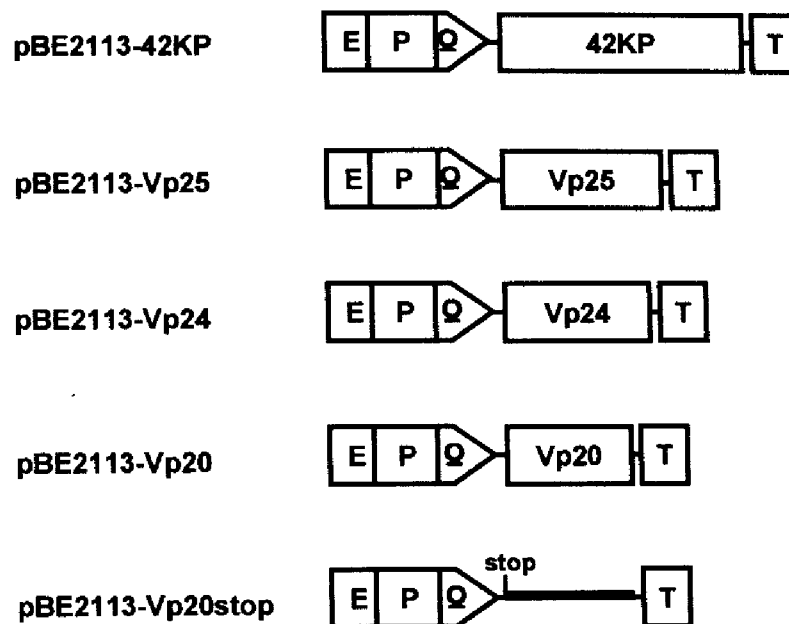
4) ALSV-RNA2 にコードされる遺伝子を一過的に発現する Ti プラスミド

ALSV-RNA2 にコードされる 4 種の遺伝子 [細胞間移行タンパク質 (42KP)

遺伝子および 3 種の CP 遺伝子 (Vp25、Vp24、Vp20) ; 48] と Vp20 遺伝子にストップコドンを導入した変異体 (Vp20stop) を一過的に発現する Ti プラスミドを以下の手順で構築した。ALSV-RNA2 の cDNA クローンである pEALSR2 (49) を鋳型として、以下の各遺伝子に特異的なプライマーペア [プラス鎖プライマーには *Bam*HI サイトと開始コドン (下線部 ; Vp20stopBam (+) にはストップコドン) を、マイナス鎖プライマーには *Sac*I サイトとストップコドン (下線部) を付加した。] を用いた PCR で増幅した : 42KP は 42KPBam (+) (5'-GCGGATCCATGGCTTTTGAGCCAATT-3') と 42KPSac (-) (5'-GGGAGCTCCTACTGACCTTCTAGCAGAT-3') ; Vp25 は Vp25Bam (+) (5'-GCGGATCCATGGGCCCTGATTTTCAACA-3') と Vp25Sac (-) (5'-GGGAGCTCCTACTGTCCTATATTATA-3') ; Vp24 は Vp24Bam (+) (5'-CGGATCCATGGGTTCTGACCCTTTT-3') と Vp24Sac (-) (5'-GGGAGCTCCTAGGTGTAACCAGCTTTG-3') ; Vp20 は Vp20Bam (+) (5'-GCGGATCCATGGGTGCTTGTTTGAGT-3') と Vp20Sac (-) (5'-GGGAGCTCCTACTCGCCTACTAAAGG-3') ; Vp20stop は Vp20stopBam (+) (5'-GCGGATCCTAGGGTGCTTGTTTGAGT-3') と Vp20Sac (-)。各 PCR 反応液をフェノール/クロロホルム抽出後、エタノール沈殿し、滅菌水で懸濁した。これらの PCR 産物を *Bam*HI と *Sac*I で処理し、同じ制限酵素処理した pBE2113-EGFP にライゲーションした。得られたクローンをそれぞれ pBE2113-42KP、-Vp25、-Vp24、-Vp20、Vp20stop とした (第 12 図)。

(2) アグロインフィルトレーション

アグロバクテリウムへの Ti プラスミドの導入、培養およびインフィルトレーシ



第 12 図. ALSV-RNA2 にコードされる遺伝子を一過的に発現する Ti プラスミドコンストラクトの模式図

pBE2113-42KP : 細胞間移行タンパク質 (42KP) を発現する
 pBE2113-Vp25、pBE2113-Vp24、pBE2113-Vp20 : 3 種の外被タンパク質 (Vp25、Vp24、Vp20) をそれぞれ発現する
 pBE2113-Vp20stop : ストップコドンが導入されているため Vp20 タンパク質は発現されない

ボックス内の E はトランスクリプショナルエンハンサー、P は CaMV 35S プロモーター、Q はトランスレイショナルエンハンサー、T はノパリンシンターゼ遺伝子ターミネーターを示している。

ョンは 2-1- (4) に記載した方法で行った。アグロバクテリウム懸濁液の濃度は OD600=1.0 に調整し、2 種のアグロバクテリウムを同時にインフィルトレーションする場合は、インフィルトレーションする直前に各懸濁液を等量混合した。7-8 葉期の mGFP 発現形質転換 *Nicotiana benthamiana* line16c [GFP-plant ; David Baulcombe 博士 (英国 ジョンイネス研究所) から分譲して頂いた] の展開葉 (第 5、6 葉) にインフィルトレーションし、25℃のグロースチャンバーで育成した。

(3) GFP 蛍光観察

mGFP の蛍光観察は Black-Ray Lamp B100AP (UVP 社) を用いて行った。暗室で長波長 UV 照射しながら、レンズにイエローフィルターを装着したデジタルカメラ (FinePix S1 Pro ; Fujifilm 社) で GFP 蛍光観察像を撮影した。

(4) RNA 抽出

1) 全 RNA 抽出

全 RNA 抽出は 2-1- (5) に記載した方法で行った。

2) 低分子 RNA の濃縮

全 RNA 溶液に等量のポリエチレングリコール (PEG) 溶液 (20% PEG8000、2 M NaCl) を加え、氷上で 1 時間インキュベートした。遠心分離 (14000 rpm、20 分間、4℃) 後、上清を回収し、2.5-3 倍容の 99.5% エタノールと 0.1 倍容の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を加えて攪拌し、-80℃で 20 分間静置した。遠

心分離（14000 rpm、15 分間、4℃）後、得られた沈殿に 1 ml の 70% エタノールを加え、再び遠心分離（14000 rpm、5 分間、4℃）した。沈殿を減圧下で乾燥後、滅菌水で懸濁した。これを低分子 RNA 溶液とした。

（5）ノーザンブロット分析

1) プローブの調整

mGFP-RNA の試験管内転写を行うため、pBluescript SK (+) に mGFP-cDNA を以下の手順でクローニングした。pBI-mGFP を *Xba*I と *Sac*I で切断し、ゲルから約 700 bp の DNA 断片を QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN 社）を用いて回収し、同制限酵素で処理した pBluescript SK (+) にライゲーションした。得られたクローンを pBSKmGFP とした。

制限酵素 *Xba*I で線状化した pBSKmGFP と T3 RNA polymerase（Promega 社）を用いて、mGFP のプラス鎖 RNA（713nt）に相補的なジゴキシゲニン（DIG）標識 RNA プローブを 2-1-（5）に記載した方法で作製した。

2) ノーザンブロット

全 RNA のノーザンブロットは 2-1-（5）に記載した方法で行った。低分子 RNA のノーザンブロットは以下の手順で行った。マイクロチューブに 10 μ l の低分子 RNA 試料、10 μ l のホルムアミドを加えて混合後、65℃で 15 分間インキュベートし、ただちに 5 分間急冷して RNA を変性させた。この溶液に 2 μ l の 10×ローディング緩衝液 [0.25% キシレンシアノール、0.25% BPB、50% グリセロール] を加え、変性 RNA 試料を調整した。これを 7 M 尿素を含む 15% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した（4℃、200V、2-3 時間）。泳動用緩衝

液には 1×TBE 緩衝液 (0.9 M トリス、0.9 M ホウ酸、20 mM EDTA) を用いた。
以後の操作は、2-1-(5) に記載した方法と同様に行った。ただし、ハイブリダイゼーションおよび 0.1×SSC、0.1% SDS による洗浄操作は 60℃で行った。

(6) イムノブロット分析

P50 および CP の葉組織からの検出は各タンパク質に特異的な抗血清を用い、2-1-(6) に記載した方法で行った。

2. 結果

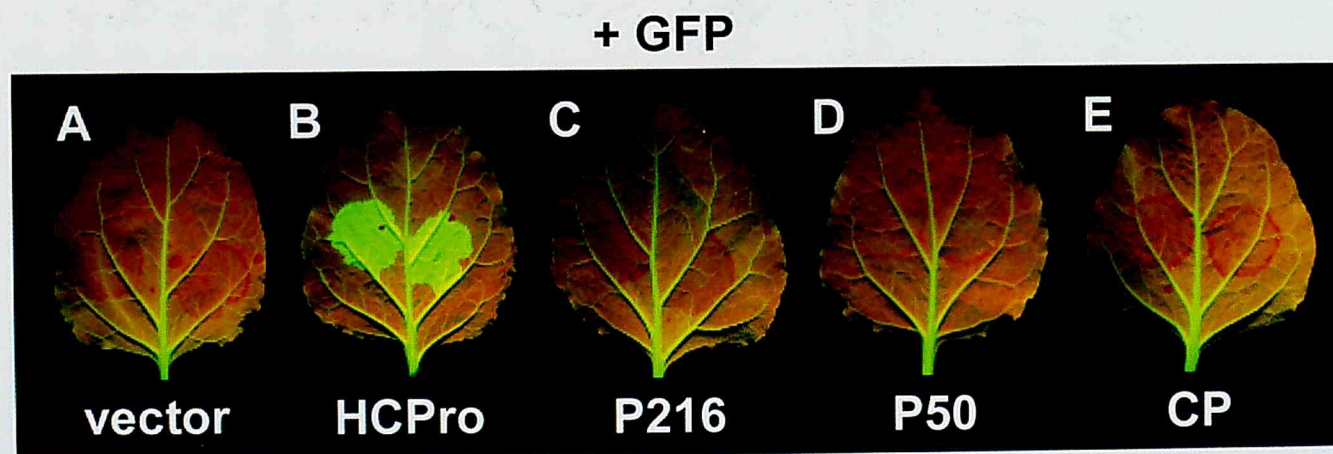
(1) ACLSV 遺伝子 (P216、P50、CP) のローカルサイレンシング抑制能

ACLSV ゲノムにコードされる 3 種の遺伝子 (P216、P50、CP) にサイレンシング抑制能があるかを調べるため、GFP 発現 *N. benthamiana* line16c (GFP-plant) を用いたアグロインフィルトレーションアッセイを行った。この方法は未知のサプレッサーを同定する際に非常に有効である。GFP-plant の展開葉にアグロインフィルトレーションで GFP 遺伝子を過剰発現させると、インフィルトレーションした領域で局所的な GFP 遺伝子のサイレンシング (ローカルサイレンシング) が誘導される。このとき、GFP 遺伝子とともにサプレッサーの候補となる遺伝子を共発現させることで、その産物が GFP に対して誘導されるサイレンシングを抑制するかどうかを調べることができる (72、94)。ポジティブコントロールとして CIYVV の HCPro 遺伝子 (pBE2113-HCPro)、ネガティブコントロールとしてベクター配列のみの pBE2113-P35T を供試した (第 10 図)。

GFP-plant の展開葉に pBI-GFP (GFP) + pBE2113-P35T (vector) をアグロインフィルトレーションすると、2-3 日後 (2-3 dpif ; days post infiltration) に GFP 蛍光が観察されたが、4-5 dpif で GFP 蛍光は消失した (第 13 図 A)。一方、GFP + pBE2113-HCPro (HCPro) をアグロインフィルトレーションした葉では 2-3 dpif で強い GFP 蛍光が観察され、その後少なくとも二週間は強い GFP 蛍光が維持された (第 13 図 B)。この結果から、CIYVV の HCPro は他のポチウイルスのそれと同様に強いローカルサイレンシング抑制活性を有していると考えられた (2、7、40)。ACLSV ゲノムにコードされる 3 種の遺伝子を発現する各 Ti プラスミド [pBE2113-P216 (P216)、pBE2113-P50 (P50) または pBE2113-CP (CP)] と GFP をアグロインフィルトレーションすると、2-3 dpif で強い GFP 蛍光は観察されず、4-5 dpif で GFP 蛍光は消失した (第 13 図 C-D)。

5 dpif にインフィルトレーションした領域から全 RNA を抽出し、ノーザンブロット分析で GFP-mRNA の蓄積レベルを解析したところ、GFP と共に vector、P216、P50 または CP をインフィルトレーションした各領域では、GFP-mRNA の蓄積が著しく低下しており、緩衝液のみを処理した葉 (Mock) の蓄積レベルと比較すると、少なくとも 8 倍減少していた。一方、GFP と HCPro をインフィルトレーションした領域の GFP-mRNA 蓄積レベルは Mock と比較しておよそ 6 倍増加していた (第 14 図)。siRNA の蓄積は RNA サイレンシングが誘導されていることの指標となる (29、30)。そこで、5 dpif の全 RNA 試料から低分子 RNA を濃縮し、ノーザン分析で GFP-siRNA の蓄積を解析した。その結果、GFP と共に vector、P216、P50 または CP をインフィルトレーションした領域では、21-25 塩基の GFP-siRNA の蓄積が検出されたが、GFP+HCPro の場合では siRNA はほとんど検出されなかった (第 14 図)。

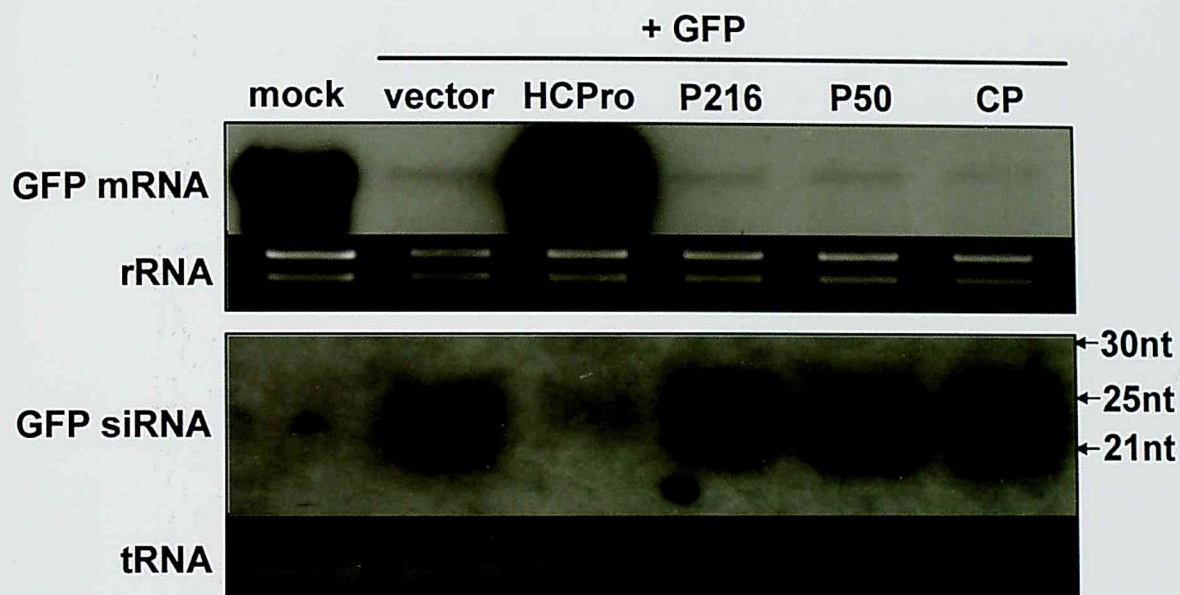
P50 および CP がインフィルトレーションした領域で蓄積するかどうかを



第13図. GFPと各遺伝子をアグロインフィルトレーションした*N. benthamiana* line 16c葉のGFP蛍光観察像

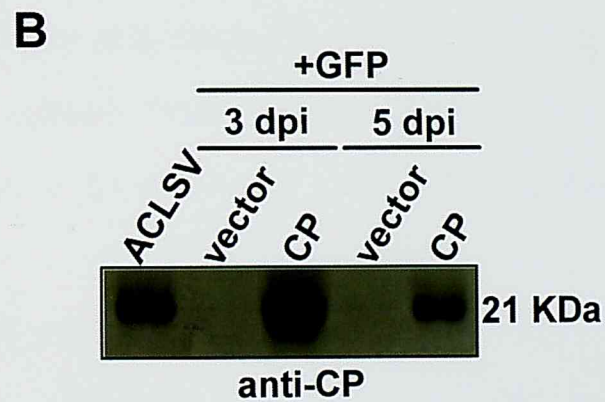
A : GFP + vector、B : GFP + HCPro、C : GFP + P216、D : GFP + P50、E : GFP + CP

インフィルトレーション後5日目にUV照射下でGFP蛍光観察像を撮影した。



第 14 図. *N. benthamiana* line 16c 葉のインフィルトレーションした領域から抽出した GFP-mRNA および GFP-siRNA のノーザンブロット分析

GFP と各コンストラクトおよび対照として緩衝液のみ (mock) を *N. benthamiana* line 16c 葉にインフィルトレーション後、5 日目にインフィルトレーションした領域から抽出した全 RNA と低分子 RNA を試料として用いた。矢印は、それぞれ 21、25、30 塩基の RNA の位置を示している。リボソーム RNA (rRNA) およびトランスファーマ RNA (tRNA) のエチジウムブロマイド染色像をローディングコントロールとして示した。



第 15 図. *N. benthamiana* line 16c 葉での P50 および CP タンパク質の蓄積

A : P50 に対する高血清を用いたイムノブロット分析

B : CP に対する高血清を用いたイムノブロット分析

GFP と各コンストラクトを *N. benthamiana* line 16c 葉にインフィルトレーション後、3 と 5 日目にインフィルトレーションした領域から抽出した全タンパク質試料を用いた。

イムノブロット分析で調べたところ、両タンパク質とも 3 dpif で蓄積が検出されたが、5dpif ではその蓄積レベルは低下していた（第 15 図 A、B）。この結果は P50 と CP はローカルサイレンシングを抑制しないという結果を支持するものである。

次に、ACLSV 感染がローカルサイレンシングを抑制するかを調べるため、GFP と pBICLSF を ACLSV の草本宿主である *N. occidentalis* の展開葉にアグロインフィルトレーションした。ポジティブコントロールとして GFP+HCPro をインフィルトレーションした葉では 2-7 dpif で強い GFP 蛍光が観察されたのに対し、GFP+pBICLSF の場合では、ネガティブコントロールの GFP+vector の場合と同様に強い GFP 蛍光は観察されなかった（データ無し）。以上より、ACLSV のコードする遺伝子（P216、P50 および CP）にはローカルサイレンシング抑制能は無い、あるいはあったとしてもその活性は低いと考えられた。

(2) P50 のシステミックサイレンシング抑制能

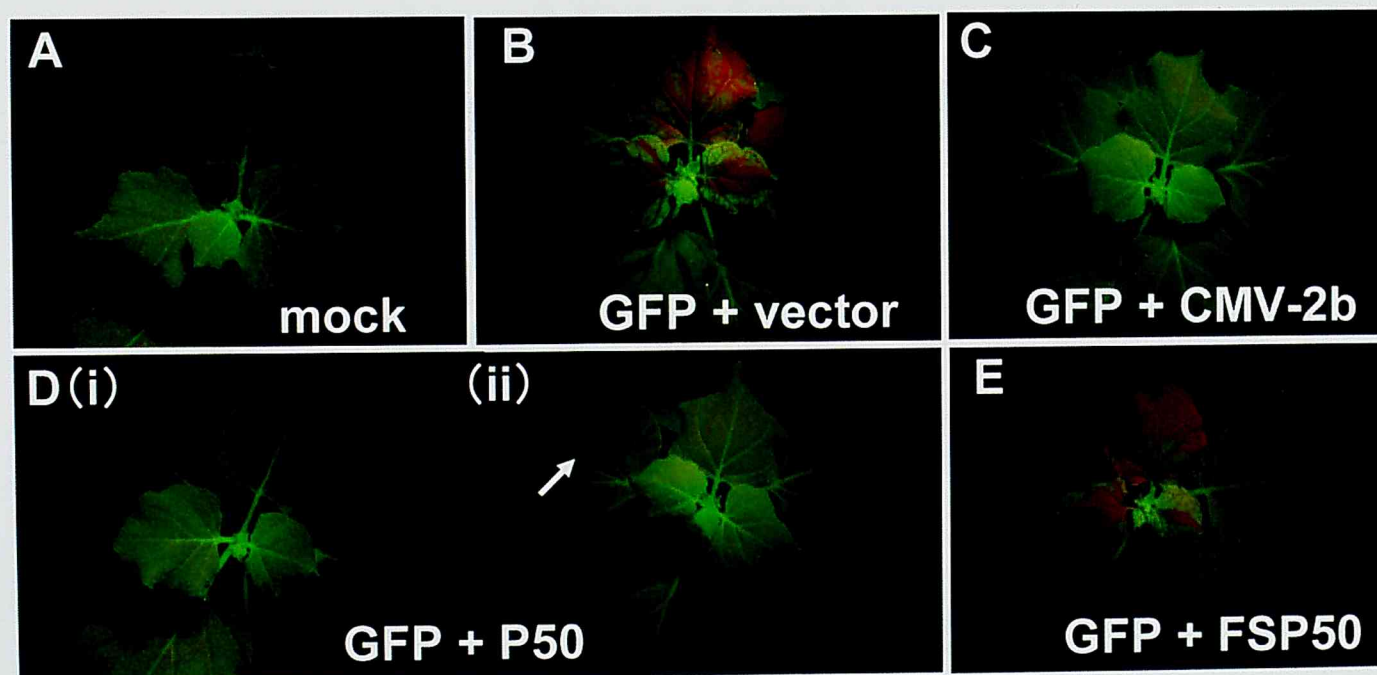
サイレンシングが誘導された細胞では、標的 RNA 配列の情報を持つサイレンシングシグナルが産生する。サイレンシングシグナルは原形質連絡（プラズマデスマータ）を通して細胞間移行し、師管を利用して植物個体全身に広がりサイレンシングの効果を拡大する（27、61、65、90、91）。このような植物全身に広がるサイレンシングは、局所的に誘導されるローカルサイレンシングに対してシステミックサイレンシングと呼ばれる。P216、P50 および CP にシステミックサイレンシング抑制能があるか調べるため、GFP と各遺伝子を GFP-plant にアグロインフィルトレーションし、上位葉で GFP のサイレンシングが誘導されるか調べた。ポジティブコントロールとして pBE2113-2b (CMV-2b)、ネガテ

イブコントロールとして vector を用いた (第 10 図)。

GFP+vector をインフィルトレーションした植物では、8 dpif で上位葉での部分的な GFP 蛍光の消失が観察され、14 dpif では全身で GFP 蛍光の消失が観察され (第 16 図 B)、インフィルトレーションした個体のほぼ全て (30 個体中 29 個体) で GFP 蛍光の消失が観察された (第 1 表)。一方、GFP+CMV-2b をインフィルトレーションした個体では、14 dpif で GFP 蛍光の消失は観察されず、mock 処理個体と同様の GFP 蛍光が観察された (第 16 図 A、C; 第 1 表)。CMV-2b はこれまでの報告と同様に、システミックサイレンシングを抑制するサプレッサーとして機能することが示された (7, 27)。

GFP+P216 または CP をインフィルトレーションした個体では、GFP+vector の場合と同様にほぼ全ての個体で GFP 蛍光の消失が観察された (第 1 表)。一方、GFP+P50 をインフィルトレーションした場合には 30 個体中 22 個体の個体で mock 処理および GFP+CMV-2b の場合と同様の GFP 蛍光が観察され、GFP 蛍光の消失が観察された個体 (30 個体中 8 個体) であっても、その程度は GFP+vector、P216 または CP の場合と比較して弱く、一部の葉の主脈およびその周辺で GFP 蛍光の消失が観察されるのみであった [第 16 図 D- (i)、(ii); 第 1 表]。P50 にフレームシフト変異を導入した pBE2113-FSP50 (FSP50) を GFP と共にアグロインフィルトレーションしたところ、ほぼ全ての個体 (30 個体中 28 個体) で GFP 蛍光の消失が観察された (第 16 図 E)。

14 dpif に上位葉から全 RNA を抽出し、ノーザンブロット分析で GFP-mRNA の蓄積レベルを解析したところ、GFP 蛍光の消失が観察された GFP+vector および GFP+FSP50 をインフィルトレーションした個体の上位葉で GFP-mRNA の蓄積が著しく減少していた。一方、mock 処理個体、GFP+CMV-2b および GFP+P50 をインフィルトレーションした個体の上位葉での GFP-mRNA 蓄積レ



第16図. GFPと各遺伝子をアグロインフィルトレーションした*N. benthamiana* line 16cの上位葉のGFP蛍光観察像

A : インフィルトレーション緩衝液のみを処理、B : GFP+vector、C : GFP+CMV-2b、D : GFP+P50、
E : GFP+FSP50

インフィルトレーション後14日目にUV照射下でGFP蛍光観察像を撮影した。図中の矢印は一部の上葉の師部およびその周辺に観察された部分的なGFP蛍光の消失部位を示している。

第1表. *N. benthamiana* line16cでのアグロインフィルトレーションアッセイにおけるACLSV遺伝子のシステミックサイレンシング抑制効果

Tiプラスミド コンストラクト	インフィルトレー ションした個体数	サイレンシングが 観察された個体数 ^a	抑制効果 (%)
GFP+Vector	30	29	3.3
GFP+CMV-2b	30	0	100
GFP+P216	7	6	14.3
GFP+P50	30	8 ^b	73.3
GFP+FSP50	30	28	6.7
GFP+CP	7	7	0
GFP+dsGFP+vector	15	14	6.7
GFP+dsGFP+CMV-2b	15	13	13.3
GFP+dsGFP+P50	15	6	60

a インフィルトレーション後14日目にシステミックサイレンシングが誘導されている個体を計数した。

b これら8個体で観察されたシステミックサイレンシングは第15図D- (ii) に示されるような程度の弱いものであった。



第 17 図. *N. benthamiana* line 16c のインフィルトレーションしていない上位葉から抽出した GFP-mRNA および GFP-siRNA のノーザンブロット分析

GFP と各コンストラクトまたは緩衝液のみ (mock) を *N. benthamiana* line 16c 葉にインフィルトレーション後、14 日目にインフィルトレーションしていない上位葉から抽出した全 RNA と低分子 RNA を試料として用いた。矢印は、それぞれ 21、25、30 塩基の RNA の位置を示している。リボソーム RNA (rRNA) およびトランスファー RNA (tRNA) のエチジウムブロマイド染色像をローディングコントロールとして示した。

ベルは Mock 処理個体と同レベルであった（第 17 図）。続いて、GFP-siRNA の蓄積を解析したところ、GFP+vector および GFP+FSP50 をインフィルトレーションした個体の上位葉では、21–25nt の GFP-siRNA の蓄積が検出されたが、mock 処理個体、GFP+CMV-2b および GFP+P50 の場合には siRNA は検出されなかった（第 17 図）。この結果から、上位葉での GFP 蛍光の消失はサイレンシングによる引き起こされていることが示された。つまり、P50 タンパク質は *N. benthamiana* でシステミックサイレンシングを抑制することが示された。

P50 が二本鎖 RNA で誘導したシステミックサイレンシングの抑制効果を示すか調べるため、GFP+pBI-dsGFP (dsGFP) +P50（または vector、CMV-2b）の比率が 1 : 1 : 2 (OD₆₀₀=0.25 : 0.25 : 0.5) になるように各アグロバクテリウム懸濁液を混合し、GFP-plant にアグロインフィルトレーションした。Vector あるいは CMV-2b を発現させた場合では、ほぼ全ての個体で GFP 遺伝子のシステミックサイレンシングが観察されたのに対して、P50 を発現させた場合では 15 個体中 9 個体でシステミックサイレンシングが抑制された（第 1 表）。この結果から、P50 は CMV-2b とは異なる作用機構でシステミックサイレンシングを抑制することが示唆された。

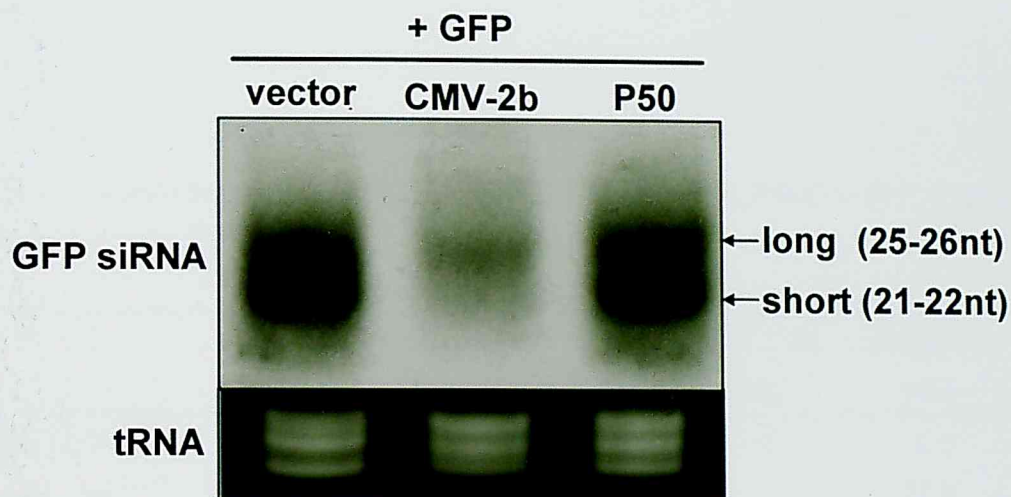
以上より、ACLSV ゲノムにコードされる 3 種の遺伝子のうち P50 がサイレンシングサプレッサー活性を持つこと、また P50 は HCPro や CMV-2b とは異なり、ローカルサイレンシングには影響せずにシステミックサイレンシングを特異的に阻害することが明らかとなった。

(3) P50 のサイレンシングシグナル移行阻害

P50 はローカルサイレンシングには影響せずにシステミックサイレンシング

を特異的に阻害する。そこで、P50 がサイレンシングシグナルの産生あるいは移行のどちらのステップを阻害しているのか明らかにするため、まず二種の siRNA (21 および 25 塩基) の蓄積レベルに P50 の影響があるかどうか調べた。サイレンシングシグナルの実体は未だ明らかではないが、siRNA が関与する可能性が報告されており、21 塩基の siRNA はシグナルの細胞間移行に、25 塩基は長距離移行に関与すると考えられている (30, 33)。GFP+P50 (または vector、CMV-2b) を GFP-plant にアグロインフィルトレーションし、5 dpif にインフィルトレーションした領域から低分子 RNA を抽出、濃縮し、ノーザンブロット分析で二種の GFP-siRNA の蓄積レベルを調べた。その結果、GFP+P50 をインフィルトレーションした領域での 21 および 25 塩基の siRNA 蓄積は、GFP+vector をインフィルトレーションした場合の蓄積と同レベルであったのに対し、GFP+CMV-2b の場合では二種の siRNA 蓄積は著しく抑制されていた (第 18 図)。

P50 がサイレンシングシグナルの移行を阻害する可能性を検証するため、Guo & Ding (27) の方法に従い、P50 (または vector、CMV-2b) を GFP-plant の展開葉の基部に、GFP を同展開葉の先端部にそれぞれアグロインフィルトレーションし、上位葉で GFP のサイレンシングが誘導されるか観察した。この実験では、葉の先端部で産生したサイレンシングシグナルが P50 の発現している基部の組織を通過することになるため、P50 がサイレンシングシグナルの移行を阻害すれば、上位葉で GFP のサイレンシングは誘導されないことになる。先端部に GFP、基部に vector をインフィルトレーションした場合ではほぼ全ての個体でシステミックサイレンシングが観察されたのに対し、P50 を基部に発現させた場合では、20 個体中 10 個体でシステミックサイレンシングが抑制された。対照として用いた CMV-2b では 15 個体中 4 個体であった。P50 は細胞間移行



第 18 図. *N. benthamiana* line 16c のインフィルトレーションした葉組織から抽出した **GFP-siRNA** のノーザンブロット分析

GFP と各コンストラクトを *N. benthamiana* line 16c 葉にインフィルトレーション後、5 日目にインフィルトレーションした領域から抽出した低分子 RNA を試料として用いた。矢印は、それぞれ 21-22nt、25-26 塩基の二種の siRNA の位置を示している。トランスファー RNA (tRNA) のエチジウムブロマイド染色像をローディングコントロールとして示した。

第2表. *N. benthamiana* line 16c葉の異なる部位で発現させたP50のシステミックサイレンシング抑制効果

Tiプラスミド コンストラクト	インフィルトレー ションした個体数	サイレンシングが観 察された個体数 ^b	抑制効果 (%)
Vector (B) / GFP (T) ^a	15	14	6.7
CMV-2b (B) / GFP (T)	15	4	73.3
P50 (B) / GFP (T)	20	10	50
P50 (T) / GFP (B)	5	5	0

a 展開葉の基部(B) と先端部(T)に各コンストラクトを別々にインフィルトレーションした。

b インフィルトレーション後14日目にシステミックサイレンシングが誘導されている個体を計数した。

タンパク質であり、自身が細胞間移行する能力を持っている (80)。そのため、基部で発現した P50 が先端部の組織まで移行し、サイレンシングが誘導されている細胞でシグナルの産生を抑制している可能性が考えられる。この可能性を排除するため、P50 を先端部に、GFP を基部にインフィльтраーションしたところ、全ての個体でシステミックサイレンシングが誘導された (第 2 表)。以上の結果より、P50 はサイレンシングシグナルの産生よりはむしろ移行を特異的に阻害することが示された。

(4) ALSV-RNA2 にコードされる遺伝子 (42KP、Vp25、Vp24、Vp20) のサイレンシング抑制能

ALSV ゲノムは二分節の一本鎖 RNA であり、RNA1 には複製関連タンパク質、RNA2 には細胞間移行タンパク質 (42KP) と 3 種の外被タンパク質 (Vp25、Vp24 および Vp20) がコードされている (48)。ALSV の RNA2 にコードされる 4 種のタンパク質 (42KP、Vp25、Vp24 および Vp20) にサイレンシング抑制能があるかを調べるため GFP-plant を用いたアグロインフィльтраーションアッセイを行った。ポジティブコントロールとして CMV-2b、ネガティブコントロールとして vector を用いた (第 10、12 図)。

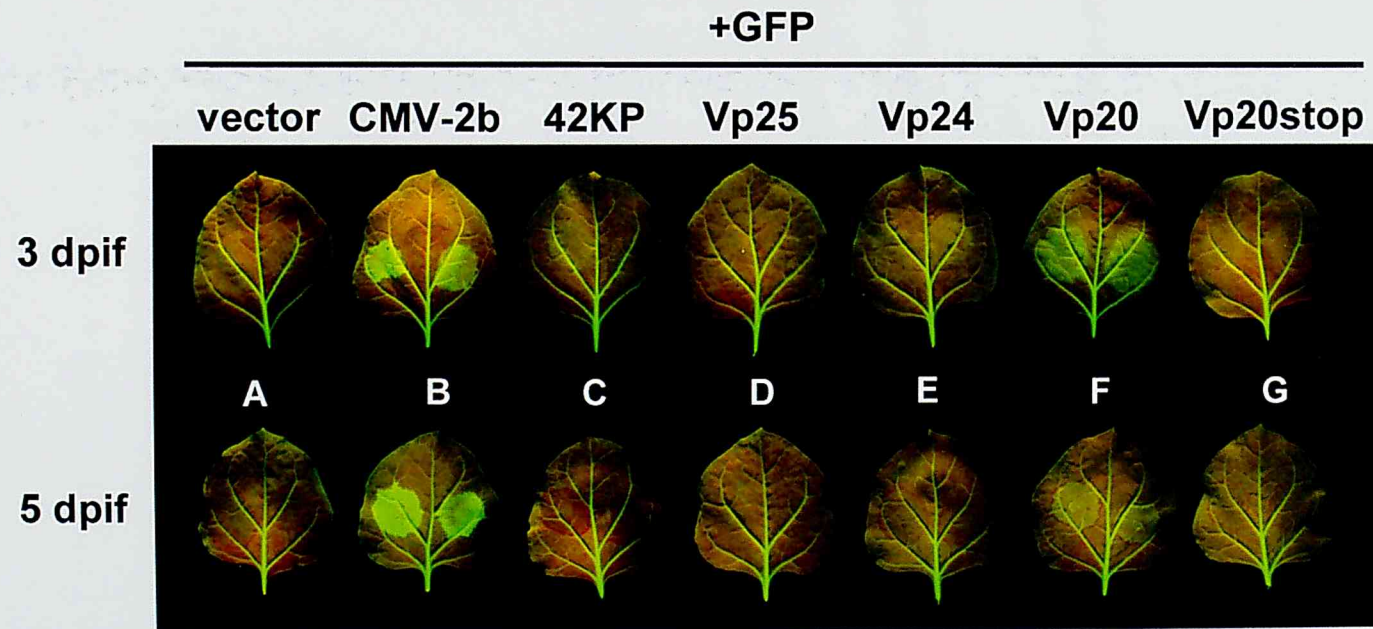
1) ローカルサイレンシング抑制能

まず、インフィльтраーションした領域で誘導されるローカルサイレンシングを抑制するか解析した。GFP-plant の展開葉に GFP+vector をアグロインフィльтраーションすると、3 dpif では GFP 蛍光が観察されず、5 dpif で GFP 蛍光は消失した (第 19 図 A)。一方、GFP+CMV-2b の場合では、3 および 5 dpif で

強い GFP 蛍光が観察された (第 19 図 B)。ALSV ゲノムにコードされる 4 種の遺伝子を発現する各 Ti プラスミド [pBE2113-42KP (42KP)、pBE2113-Vp25 (Vp25)、pBE2113-Vp24 (Vp24) または pBE2113-Vp20 (Vp20)] +GFP をアグロインフィルトレーションした場合には、42KP、Vp25 および Vp24 では GFP +vector の場合と同様に、3-5 dpif で GFP 蛍光は観察されなかった (第 19 図 C-E)。一方、Vp20+GFP の場合には 3 dpif で GFP 蛍光が観察されたが、5 dpif ではその蛍光の強さは低下した (第 19 図 F)。また、GFP+pBE2113-Vp20stop (vp20stop) の場合には、3-5 dpif で GFP 蛍光は観察されなかった (第 19 図 G)。5dpif にインフィルトレーションした領域から全 RNA および低分子 RNA を抽出し、ノーザンブロット分析で GFP の mRNA および siRNA の蓄積レベルを解析した。GFP と vector、42KP、Vp25、Vp24、Vp20 あるいは Vp20stop をインフィルトレーションした領域では、mock 処理区と比較して GFP-mRNA の蓄積が著しく抑制されていたが、GFP+CMV-2b の場合には Mock と比較して蓄積レベルが増加していた (第 20 図)。一方、GFP と vector、42KP、Vp25、Vp24、Vp20 あるいは Vp20stop を発現させた場合には GFP-siRNA の蓄積が検出されたのに対し、GFP+CMV-2b の場合にはその蓄積はほとんど検出されなかった (第 20 図)。これらの結果から、Vp20 にローカルサイレンシング抑制能は無いかあるいは非常に弱いと考えられた。

2) システミックサイレンシング抑制能

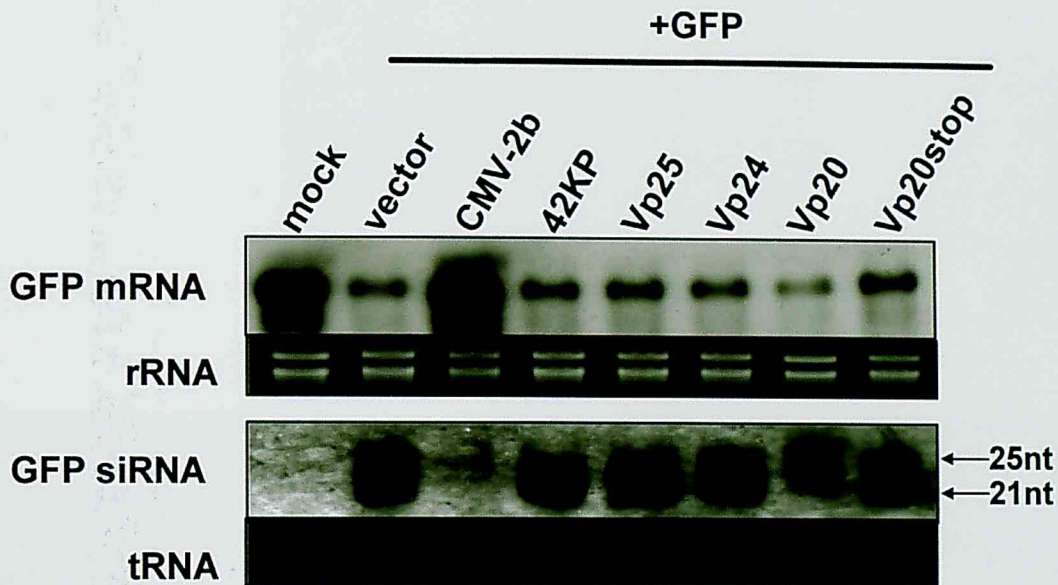
次に、システミックサイレンシングを抑制するか解析した。GFP と vector、42KP、Vp25、Vp24 あるいは Vp20stop をインフィルトレーションした植物では、14 dpif で全身での GFP 蛍光の消失が観察され (第 21 図 A)、インフィルトレーションした個体のほぼ全てで GFP 蛍光の消失が観察された (第 3 表)。一方、



第19図. GFPと各遺伝子をアグロインフィルトレーションした*N. benthamiana* line 16c葉のGFP蛍光観察像

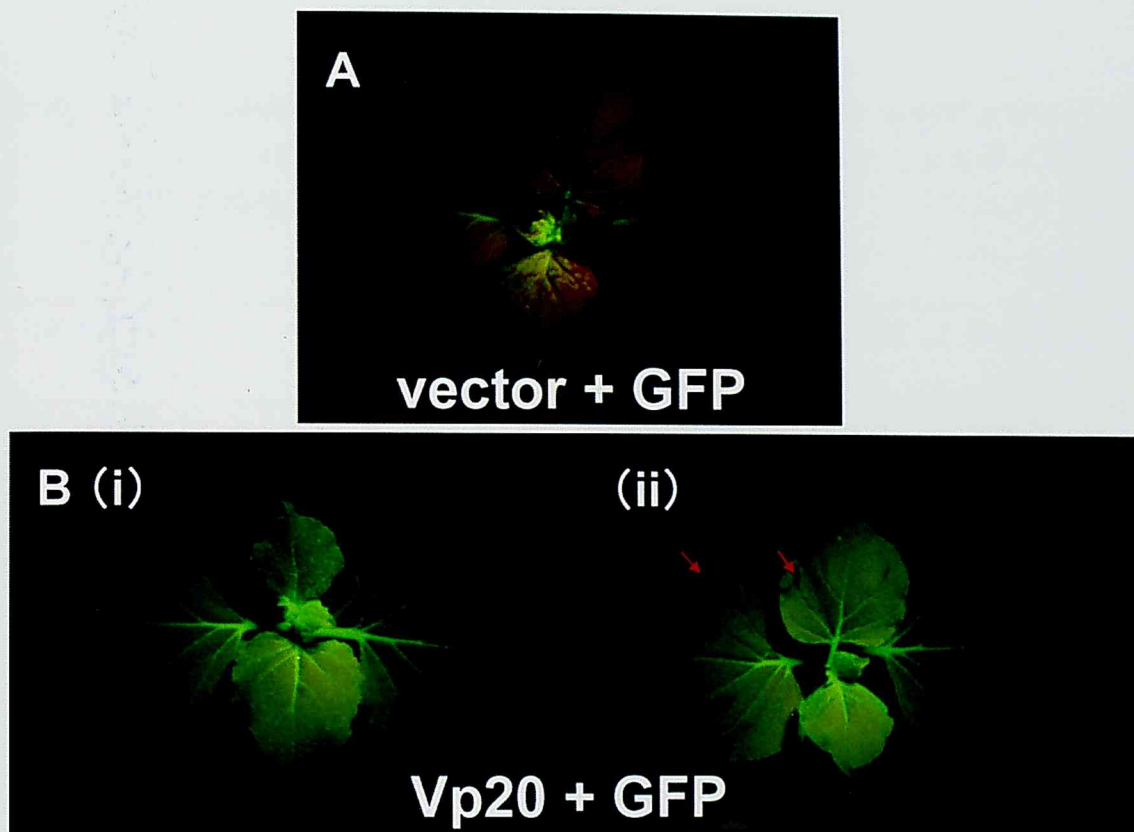
A : GFP+vector、B : GFP+CMV-2b、C : GFP+42KP、D : GFP+Vp25、E : GFP+Vp24、
F : GFP+Vp20、G : GFP+Vp20stop

インフィルトレーション後3日目 (3 dpif) と5 dpifにUV照射下でGFP蛍光観察像を撮影した。



第 20 図. *N. benthamiana* line 16c 葉のインフィルトレーションした領域から抽出した **GFP-mRNA** および **GFP-siRNA** のノーザンブロット分析

GFP と各コンストラクトまたはインフィルトレーション緩衝液のみ (mock) を *N. benthamiana* line 16c 葉にインフィルトレーション後、5 日目にインフィルトレーションした領域から抽出した全 RNA と低分子 RNA を試料として用いた。矢印は、それぞれ 21、25 塩基の RNA の位置を示している。リボソーム RNA (rRNA) およびトランスファー RNA (tRNA) のエチジウムブロマイド染色像をローディングコントロールとして示した。



第 21 図. GFP と vector または Vp20 をインフィルトレーションした *N. benthamiana* line 16c の上位葉の GFP 蛍光観察像

インフィルトレーション後 14 日目に UV 照射下で撮影した。赤色の矢印は、一部の上葉の師部およびその周辺に観察された部分的な GFP 蛍光の消失部位を示している。

第3表. *N. benthamiana* line16cでのアグロインフィльтраーションアッセイ
におけるALSV-RNA2にコードされる遺伝子のシステムックサイレン
シング抑制効果

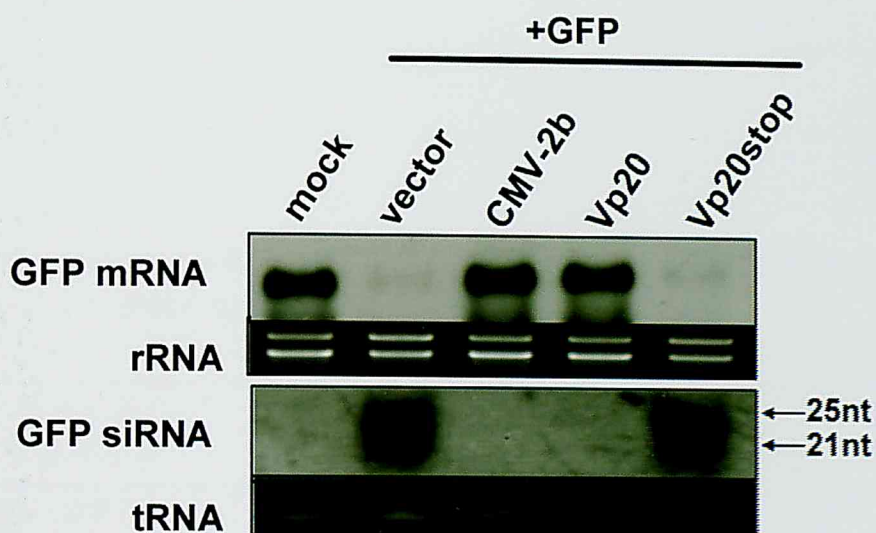
Tiプラスミド コンストラクト	インフィльтраー ションした個体数	サイレンシングが観 察された個体 ^a	抑制効果 (%)
GFP+Vector	15	14	6.7
GFP+CMV-2b	15	2	86.7
GFP+42KP	10	9	10.0
GFP+Vp25	10	10	0
GFP+Vp24	10	10	0
GFP+Vp20	20	8 ^b	60.0
GFP+Vp20stop	10	10	0

a インフィльтраーション後14日目にシステムックサイレンシングが誘導され
ている個体を計数した。

b これら8個体で観察されたシステムックサイレンシングは第20図B- (ii) に示
されるような程度の弱いものであった。

GFP+Vp20 をインフィルトレーションした個体では、mock 処理および GFP+CMV-2b の場合と同様の GFP 蛍光が観察され (20 個体中 12 個体)、GFP 蛍光の消失が観察された個体 (20 個体中 8 個体) であっても、その程度は弱く、一部の葉の主脈およびその周辺で GFP 蛍光の消失が観察されるのみであった [第 21 図 B- (i)、(ii) ; 第 3 表]。14 dpif にインフィルトレーションしていない上位葉を用いてのノーザンブロット分析により GFP の mRNA および siRNA の蓄積レベルを解析した。GFP 蛍光の消失が観察された GFP+vector および GFP+Vp20stop をインフィルトレーションした個体の上位葉では GFP-mRNA の蓄積が著しく減少したのに対し、mock 処理個体、GFP+CMV-2b および GFP+Vp20 の場合では GFP-mRNA 同レベルで蓄積していた (第 22 図)。GFP-siRNA の蓄積を調べたところ、GFP+vector および GFP+Vp20stop の場合では 21-25nt の GFP-siRNA が検出されたが、GFP+CMV-2b および GFP+Vp20 の場合では検出されなかった (第 22 図)。これらの結果より Vp20 はシステミックサイレンシングを抑制することが示唆された。

Vp20 がシグナルの移行を阻害するか調べるため、Vp20 (または vector、P50、CMV-2b) を GFP-plant の展開葉の基部に、GFP を同展開葉の先端部にそれぞれアグロインフィルトレーションし、上位葉で GFP のサイレンシングが誘導されるか観察した。先端部に GFP、基部に vector をインフィルトレーションした場合には、ほぼ全ての個体でシステミックサイレンシングが観察されたのに対し、Vp20 を基部に発現させた場合では 10 個体中 6 個体、P50 の場合では 10 個体中 5 個体、CMV-2b では 8 個体中 6 個体でシステミックサイレンシングが抑制された (第 4 表)。以上より、ALSV-RNA2 にコードされる Vp20 は P50 および CMV-2b と同様にサイレンシングシグナルの移行を阻害することが示された。



第 22 図. *N. benthamiana* line 16c のインフィルトレーションしていない上位葉から抽出した GFP-mRNA および GFP-siRNA のノーザンブロット分析

GFP と各コンストラクトまたはインフィルトレーション緩衝液のみ (mock) を *N. benthamiana* line 16c 葉にインフィルトレーション後、14 日目にインフィルトレーションしていない上位葉から抽出した全 RNA と低分子 RNA を試料として用いた。矢印は、それぞれ 21、25 塩基の RNA の位置を示している。リボソーム RNA (rRNA) およびトランスファー RNA (tRNA) のエチジウムブロマイド染色像をローディングコントロールとして示した。

第4表. *N. benthamiana* line 16c葉の基部に発現させたVp20のシステミックサイレンシング移行阻害効果

Tiプラスミド コンストラクト	インフィルトレー ションした個体数	サイレンシングが 観察された個体数 ^b	抑制効果 (%)
Vector (B) / GFP (T) ^a	8	7	12.5
CMV-2b (B) / GFP (T)	8	2	75
P50 (B) / GFP (T)	10	5	50
Vp20 (B) / GFP (T)	10	4	60

a 展開葉の基部(B) と先端部(T)に各コンストラクトを別々にインフィルトレーションした。

b インフィルトレーション後14日目にシステミックサイレンシングが誘導されている個体を計数した。

3. 考察

本研究ではまず、ACLSV のコードする遺伝子に RNA サイレンシングサプレッサー活性があるか *N. benthamiana* line16c (GFP-plant) を用いたアグロインフィルトレーションアッセイで解析した。その結果、ACLSV のコードする 3 種のタンパク質 (P216、P50 および CP) はいずれもアグロインフィルトレーションした細胞内で引き起こされるローカルサイレンシングは抑制しないが (第 13、14 図)、P50 を発現させた場合にはサイレンシングシグナルの移行によりインフィルトレーションしていない上位葉で引き起こされるシステミックサイレンシングを抑制した (第 16、17 図、第 1 表)。P50 は多機能性タンパク質であり、次のような機能を持つことが報告されている：1) ACLSV 感染植物または P50 発現形質転換植物の細胞内で原形質連絡 (プラズモデスマータ) に局在し、師管の側壁層および師板に蓄積する (104)；2) P50 自身が細胞間移行能を持つ (80)；3) 他分子の細胞間移行を促進する (80)；4) プロトプラストの表面から突出した管状構造を形成する (37、80)；5) 2 箇所の核酸結合ドメインを持つ (38)；6) ACLSV と同属のブドウえそ果ウイルスのコードする MP の機能を特異的に阻害する (37、105)。以上の機能に加えて、本研究で RNA サイレンシングサプレッサーとして機能することを明らかにした。P50 は 30K スーパーファミリーに属しており (62)、このスーパーファミリーのタンパク質でサイレンシングサプレッサー活性があることを報告するのは本研究が初めてである。

P50 のシステミックサイレンシング抑制効果は完全ではなく、その抑制効率是一本鎖 RNA または二本鎖 RNA でサイレンシングを誘導した場合でそれぞれ 73.3、60%であった (第 1 表)。この不完全な抑制効果は P50 がローカルサイレンシングを抑制しないことに起因しているかもしれない。なぜならローカルサ

サイレンシングを抑制しないタンパク質では、自身のタンパク質をコードする mRNA がサイレンシングにより分解されるため、インフィルトレーション後 2-3 日目で発現量が低下するからである (95)。実際に P50 はインフィルトレーション後 3 日目では高レベルで蓄積しているが、5 日目ではその蓄積レベルは著しく低下していた (第 15 図 A)。

本研究でコントロールとして用いた CMV *pepo* 系統の 2b タンパク質 (CMV-2b) は一本鎖 RNA でサイレンシングを誘導した場合にはローカルおよびシステミックサイレンシングを抑制した (第 16-18 図、第 1 表)。しかしながら二本鎖 RNA でサイレンシングを誘導した場合にはシステミックサイレンシングを抑制しなかった (第 1 表) この結果はトマトアスパーミウウイルス (*Tomato aspermy virus*; TAV) の 2b タンパク質 (TAV-2b) と同様であった (11)。一方で P50 は一本鎖、二本鎖 RNA のどちらでシステミックサイレンシングを誘導した場合でも阻害効果を示し (第 1 表)、また、二種の siRNA 蓄積に影響しないことから (第 18 図)、CMV-2b タンパク質とは異なる作用機構でシステミックサイレンシングを抑制すると考えられた。さらに、P50 がサイレンシングシグナルの産生と移行のどちらを阻害するか調べるため、P50 を GFP-plant の展開用の基部に発現させ、同じ葉の先端部で GFP のサイレンシングを誘導したところシステミックサイレンシングを阻害した (第 2 表)。以上の結果から、P50 はサイレンシングシグナルの産生よりはむしろ移行を阻害することが強く示唆された。サイレンシングシグナルの実体は未だ明らかにされていないが、サイレンシングシグナルはプラズモデスマータを介して細胞間移行し、さらに師管を通して全身に拡大していく (65、92)。P50 は細胞内ではプラズモデスマータに局在し、さらに師管および師板に蓄積することから (80、104)、サイレンシングシグナルが細胞間あるいは組織間移行する際にシグナル分子を捕獲し

ているのかもしれない。あるいはサイレンシングシグナルの移行に関与する宿主因子と相互作用する可能性も考えられる。

ACLSV と同様に果樹を宿主とする ALSV についてもサイレンシングサプレッサーの解析を行った。ALSV-RNA2 にコードされる 3 種の外被タンパク質 (Vp25、Vp24 および Vp20) のうち Vp20 がサイレンシングサプレッサー活性を持ち、P50 と同様にサイレンシングシグナルの移行を阻害することでシステムックサイレンシングを抑制することを明らかにした(第 19-22 図、第 3、4 表)。GFP 配列を ALSV ゲノムに組み込んだ ALSV (GFP-ALSV) を GFP 発現形質転換 *N. tabacum* に感染させると、ALSV の感染している領域で形質転換植物由来の GFP 遺伝子のサイレンシングが誘導される (100)。しかしながら、ALSV 感染は常に GFP 遺伝子のサイレンシングに先行して拡大し、サイレンシングシグナルの移行によるシステムックサイレンシングは観察されない。おそらく、ALSV の感染拡大には Vp20 のシステムックサイレンシングを抑制する機能が重要な役割を果たしているだろう。

P50 および Vp20 のようにシステムックサイレンシングを特異的に阻害するサプレッサーの報告例は少なく、カンキツトリステザウイルス (*Citrus tristeza virus* ; CTV) の CP と *Rice yellow mottle virus* (RYMV) の P1 タンパク質のみである (30、33、52)。RYMV-P1 は長鎖 siRNA (24-26nt) の蓄積を阻害するが、CTV-CP は P50 や Vp20 と同様にローカルサイレンシングにはほとんど影響せずにシステムックサイレンシングを抑制する。興味深いことに ACLSV、ALSV および CTV はいずれも永年性果樹を宿主とするウイルスであり、システムックサイレンシングを特異的に阻害する機能を持ったサプレッサーは果樹での持続的感染に重要なものかもしれない。P50 発現形質転換 *N. occidentalis* に ACLSV-cDNA クローン (pBICLSF) をアグロインフィльтраーションで接種すると、非形質

転換体の場合と比較して激しい病気が引き起こされ、細胞レベルでの増殖量には顕著な差は認められないが、長距離移行能が促進される（データ無し）。これは形質転換植物が発現している P50 がサプレッサーとして機能することに起因する可能性が考えられる。しかしながら、P50 は細胞間移行タンパク質なのでシステミックサイレンシング抑制能とは別にウイルス移行を促進した結果、激しい症状が観察された可能性も考えられる。今後、P50 のサイレンシングサプレッサーとしての機能が ACLSV 感染にどのように貢献しているか、また細胞間移行タンパク質としての機能と関連するか明らかにする必要があるだろう。

第 4 章

ACLSV-P50 のシステミックサイレンシング抑制機構の解析

第 3 章で ACLSV ゲノムにコードされる細胞間移行タンパク質 (P50) がサイレンシングサプレッサーとして機能することを明らかにした。P50 のサイレンシングに対する作用機構はこれまでに報告されている多くのサプレッサーと異なっており、サイレンシングシグナルの移行を阻害することで、植物全身にサイレンシングの効果が拡大するのを抑制していると考えられる。本研究では、P50 がどのようにしてサイレンシングシグナルの移行を阻害するか明らかにしようとした。

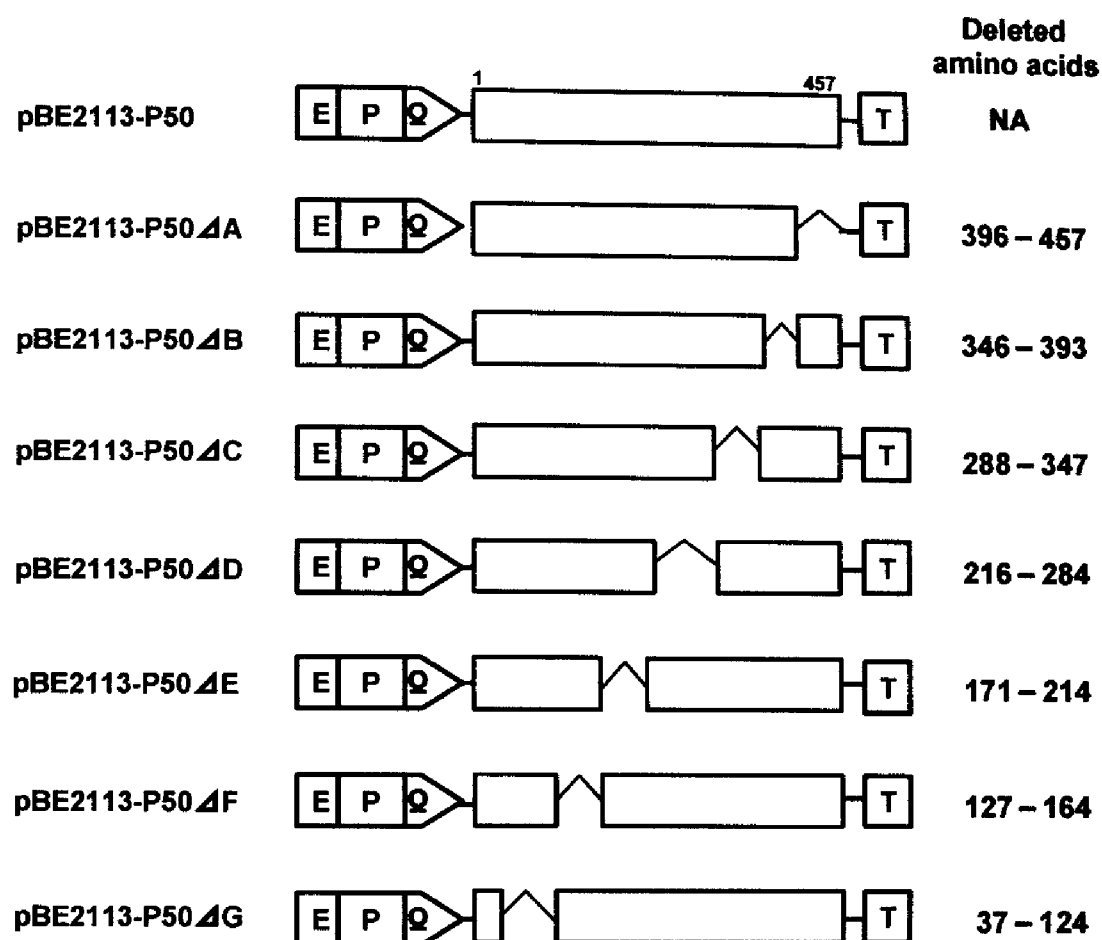
1. 材料と方法

(1) 欠失型 P50 変異体を一過的に発現する Ti プラスミド

P50 遺伝子の異なる領域を欠失した変異体を発現する Ti プラスミド (第 23 図 ; pBE2113-P50 Δ A、P50 Δ B、-P50 Δ C、-P50 Δ D、-P50 Δ E、-P50 Δ F、-P50 Δ G、) は本研究室保存のクローンを用いた (80、81)。

(2) P50 発現形質転換 *Nicotiana benthamiana* の作出

本研究室で田村 (2006 ; 82) の方法で作出した P50 を発現する形質転換 *Nicotiana benthamiana* (P50c) から T1 種子を得た。実験には T₁ および T₂ 世代の種子を用いた。



第 23 図. P50 遺伝子を部分的に欠失した変異型 P50 を一過的に発現する Ti プラスミドコンストラクトの模式図

各欠失型 P50 変異体は右に示したアミノ酸領域を欠失している。ボックス内の E はトランスクリプショナルエンハンサー、P は CaMV 35S プロモーター、Q はトランスレイショナルエンハンサー、T はノパリンシンターゼ遺伝子ターミネーターを示している。

(3) 接木試験

GFP 発現 *N. benthamiana* line16c (GFP-plant)、P50 発現 *N. benthamiana* lineC (P50-plant) および非形質転換 *N. benthamiana* (NT-plant) を用いた 2 通りの接木試験を行った (第 24 図)。P50-plant は T₁ および T₂ 世代の種子を用い、イムノブロット分析 [2-1-(7)] で P50 の発現量が高い個体を選抜して実験に用いた。

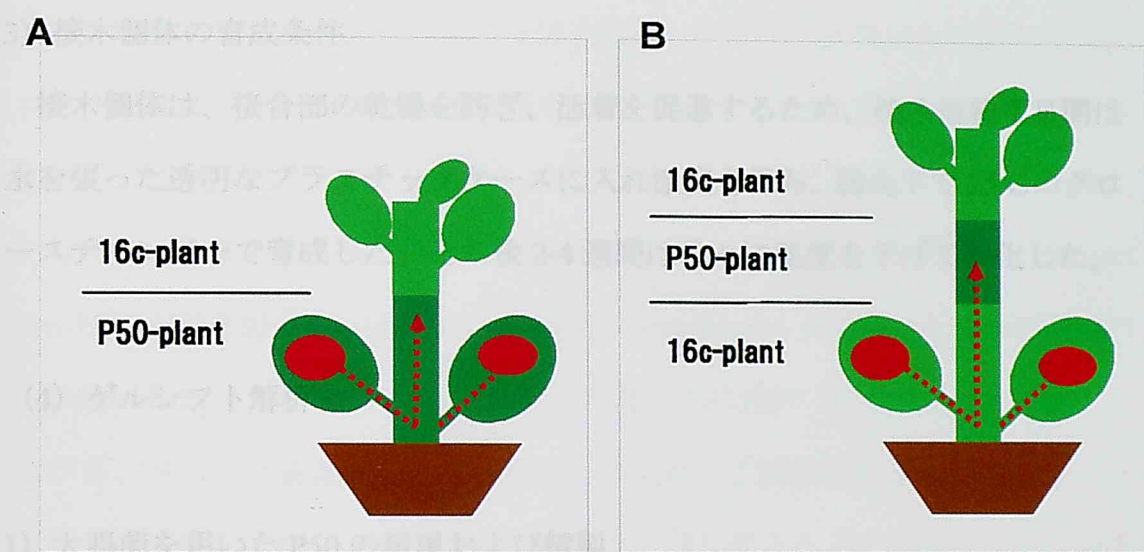
1) P50-plant (または NT-plant) を台木に用いる二段接ぎ

P50-plant (または NT-plant) を台木に、GFP-plant を穂木に用いた接ぎ木は以下の手順で行った (第 24 図 A)。植物はいずれも 9-10 葉期の個体を用いた。台木となる P50-plant (または NT-plant) の茎を剃刀で水平に切断し、第 1-6 葉を残して上部を除去した。穂木となる GFP-plant は第 7-10 葉に相当する上部を用い、第 7-9 葉は除去した。台木の切断面に垂直となるように約 1cm の切れ込みを入れ、くさび形に切断した穂木を台木の切れ込みに合うように接合し、接木クリップまたはパラフィルムで接合部を固定した。

2) P50-plant (または NT-plant) を中間台木に用いる三段接ぎ

P50-plant (または NT-plant) を中間台木に、GFP-plant を台木と穂木に用いた接ぎ木は以下の手順で行った (第 24 図 B)。植物はいずれも 10-12 葉期の個体を用いた。台木となる GFP-plant の茎を剃刀で水平に切断し、第 1-6 葉より上部を除去した。P50-plant (または NT-plant) の第 6-8 葉に相当する茎 (約 2cm) を中間台木として用いた。中間台木は付随の葉は切除し、下部はくさび形に、上部には垂直に約 1cm の切れ込みをいれた。穂木となる GFP-plant は第 8-12 葉

に相当する上部を用い、第 3-11 葉は除去した。右側の根部分に腐敗となるように約 1cm の切れ込みを入れ、くさび形に切開した中間台木や台木の切れ込みに合致するように接合した。同様の方法で中間台木の上部に穂木を接合させ、2 箇所の接合部は接木クリップまたはパラフィルムで固定した。



第 24 図. GFP-plant と P50-plant を用いた接木試験の原理

A : P50 あるいは NT-plant を台木とし、GFP-plant を穂木として接木する

B : GFP-plant を台木、P50 または NT-plant を中間台木、そして GFP-plant を穂木として接木する

台木の展開葉に一本鎖および二本鎖 GFP-RNA をアグロインフィルトレーションで過剰発現させ、システミックサイレンシングを誘導した。

に相当する上部を用い、第 8-11 葉は除去した。台木の切断面に垂直となるように約 1cm の切れ込みを入れ、くさび形に切断した中間台を台木の切れ込みに合うように接合した。同様の方法で中間台木の上部に穂木を接合させ、2 箇所の接合部は接木クリップまたはパラフィルムで固定した。

3) 接木個体の育成条件

接木個体は、接合部の乾燥を防ぎ、活着を促進するため、接木後約 7 日間は水を張った透明なプラスチックケースに入れ湿度を保ち、弱光下で 25℃のグロースチャンバーで育成した。その後 2-4 週間は徐々に湿度を下げて馴化した。

(4) ゲルシフト解析

1) 大腸菌を用いた P50 の発現および精製

pET3a (Novagen 社) に P50 遺伝子をライゲーションしたプラスミド (pET3a-P50 ; 38) で大腸菌 [BL21 (DE3) pLysS] を 2-1-(1) の方法で形質転換した。ただし抗生物質として 50 μ g/ml のカルベニシリンナトリウム、34 μ g/ml のクロラムフェニコールを含む LB 寒天培地を用いた。LB 寒天培地上に形成した単一の白色コロニーを、滅菌済みの爪楊枝を用いて、50 μ g/ml のカルベニシリンナトリウム、34 μ g/ml のクロラムフェニコールを含む 2 ml の LB 液体培地に移し換え、37℃で 12 - 16 時間振盪培養した。この培養液 1 ml を 100ml の LB 液体培地 (50 μ g/ml のカルベニシリンナトリウム、34 μ g/ml のクロラムフェニコールを含む) に加え、37℃で 2 時間振盪培養し、0.1 M IPTG を最終濃度が 0.4 mM になるように加え、さらに 2 時間振盪培養した。培養液を氷中で 10 分間静置後、遠心分離 (6000 rpm、10 分間、4℃) した。得られた

沈殿に 10 ml の $T_{50}E_2$ [Tris-HCl (pH 8.0)、2 mM EDTA] を加え懸濁後、超音波式ホモジナイザー (Titec 社) を用いて氷中で 20 分間ソニケーションして大腸菌を破碎し、遠心分離 (10000 rpm、10 分間、4℃) した。沈殿に 10 ml の $T_{50}E_2$ を加え懸濁後、超音波式ホモジナイザーを用いて氷中で 20 分間ソニケーションし、遠心分離 (10000 rpm、10 分間、4℃) で上清を除去した。この洗浄操作を 3 回繰り返した後、10 ml の $T_{50}E_2$ を加え懸濁し、タンパク質純化溶液とした。

以下の方法で P50 の変性および再生を行った。タンパク質純化溶液に尿素を 8 M になるように加え、5 分間激しく攪拌後、遠心分離 (14000 rpm、10 分間、4℃) した。上清を透析膜で覆ったカップに分注し、タンパク質再生溶液 [50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM NaCl、2.5 mM dithiothreitol (DTT)、1 M NDSB-201 (Calbiochem 社)] に浸し、スターラーで穏やかに攪拌 (4℃、14–20 時間) しながら、タンパク質溶液の尿素を透析した。続いて滅菌水に浸し、スターラーで穏やかに攪拌 (4℃、1 時間) し、滅菌水を移し変えるという操作を 4 回繰り返した。透析後、タンパク質溶液をマイクロチューブに移し、遠心分離 (14000 rpm、10 分間、4℃) した。上清を再生タンパク質溶液とした。

タンパク質試料は 2-1- (7) の方法で SDS-PAGE し、泳動終了後、ゲルをクマジー染色液 (0.25% クマジーブリリアントブルー、50% メタノール、10% 酢酸) で 10–20 分間浸し、続いて脱色液 (10% メタノール、5% 酢酸) に浸してタンパク質バンドを検出した。タンパク質量を段階的に希釈したウシ血清アルブミン (BSA) タンパク質試料を同じゲルで電気泳動し、検出されるバンドの濃さを比較することで目的タンパク質の濃度を測定した。

2) RNA の合成

3'末端の 2 塩基が突出するような合成二本鎖 siRNA (ds-siRNA) を作製する

ために mGFP 配列を基に TAKARA Custom siRNA Synthesis サービス (TAKARA 社) に依頼し、21 塩基 [siRNA_{mGFP21} (+) ; (5'-UUGGCGAUGGCCCUGUCCUUU-3') と siRNA_{mGFP21} (-) ; (5'-AGGACAGGGCCAUCGCCAAUU-3')] および 25 塩基 [siRNA_{mGFP25} (+) ; (5'-ACUACCUGUUGCAUGGCCAACACUU-3') と siRNA_{mGFP25} (-) (5'-GUGUUGGCCAUGGAACAGGUAGUUU-3')] のセンス鎖、アンチセンス鎖 RNA を合成した。これらの合成一本鎖 RNA (ss-21、ss-25) を用いて以下の手順で ds-siRNA (ds-21、ds-25) を作製した。センス鎖、アンチセンス鎖の各 RNA (25 μ g) を等量混合し、溶液量の 1/4 量の 5 \times アニール緩衝液 [150 mM HEPES-KOH (pH 7.4)、500 mM 酢酸カリウム、10 mM 酢酸マグネシウム] を加え混合後、95 $^{\circ}$ C で 1 分間、70 $^{\circ}$ C で 1 分間加熱し、1 時間かけて 37 $^{\circ}$ C まで温度を下げ、さらに 37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。反応液を 15% ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (ポリアクリルアミドとビスアクリルアミドの比率は 39 : 1 にした。) し、泳動終了後のゲルをエチジウムブロマイド染色した。UV 照射下で目的のバンドを含むゲル片を切り出し、マイクロチューブに移した後、ゲル片 (mg) 当たり 2 倍容の PAG 溶出液 [0.5 M 酢酸アンモニウム (pH 8.0)、1 mM EDTA (pH 8.0)、10 mM 酢酸マグネシウム] を加え、37 $^{\circ}$ C で 12-18 時間インキュベートした。遠心分離 (14000 rpm、10 分間、4 $^{\circ}$ C) 後、上清を新しいチューブに回収した。ゲル片の残ったチューブに再び 2 倍容の PAG 溶出液を加え、37 $^{\circ}$ C で 4 時間インキュベートした。遠心分離 (14000 rpm、10 分間、4 $^{\circ}$ C) 後、上清を回収した。回収した上清はフェノール/クロロホルム抽出後、ProbeQuant G-50 Micro Columns (Amersham 社) を用いて精製し、ds-21、-25 溶液とした。

400 塩基の二本鎖 RNA (ds-400) を合成するために、mGFP の 5' 末端から 400bp

の cDNA 断片を pBluescript SK+に以下の手順でクローニングした。pBSKmGFP を 鋳 型 DNA と して セ ン ス 鎖 プ ラ イ マ ー [mGFPBam (+) ; (5'-CGCGGATCCATGAGTAAAGGAGAACTT-3') (下線部は *Bam*HI サイト)] と マ イ ナ ス 鎖 プ ラ イ マ ー [mGFP400Xba (-) ; (5'-TGCTCTAGATTACGTCCTCCTTGAAATCGA-3') (下線部は *Xba*I サイト)] を用いた PCR を行い、PCR 産物を *Bam*HI と *Xba*I で切断後、ゲルから約 400bp の DNA 断片を回収し、同制限酵素で処理した pBluescript SK (+) にライゲーションした。得られたクローンを pBSKmGF400 とした。

制限酵素 *Bam*HI (または *Xba*I) で線状化した pBSKmGF400 と T3 RNA polymerase (あるいは T7 RNA polymerase ; Promega 社) を用いて、mGFP の マイナス鎖 RNA (またはプラス鎖 RNA) を 2-1-(5) に記載した方法で作成した。ただし、10×DIG labeling mix の代わりに最終濃度が各 0.5 mM になるように 2.5 mM の rATP、rCTP、rGTP、rUTP (Promega 社) をそれぞれ加えて転写反応を行った。

ds-400 を作製する場合には、アニーリング反応後に反応液をエタノール沈殿し、RNase A/T1 溶液 (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM EDTA、300 mM NaCl、40 ng/μl RNase A、0.2 units/μl RNase T1) に懸濁後、37℃で 1 時間インキュベートして二本鎖 RNA の一本鎖 RNA 部分を分解した。反応液をフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿後、5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、上述した方法でゲルから目的のバンドを回収した後、精製した。得られた溶液を ds-400 溶液とした。

3) プロープ RNA の 5'末端標識

2)で合成した二本鎖 RNA (ds-21、ds-25) と一本鎖 RNA (ss-21、ss-25) を

T4 polynucleotide kinase (T4PNK) と $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP を用いて以下の手順で 5'末端を ^{32}P 標識した。

5 μl (1 pmol/ μl) の合成 RNA、15 μl の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 溶液 (約 6 MBq ; GE healthcare 社)、10 μl の 5 \times T4PNK 緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH9.5)、10 mM MgCl_2 、5 mM DTT、5% グリセロール]、2 μl の T4 PNK (10 units/ μl ; TAKARA 社)そして 18 μl の滅菌水を加えて混合し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間インキュベートした。反応液をフェノール/クロロホルム抽出後、上清を ProbeQuant G-50 Micro Columns (Amersham 社) を用いて精製し、 ^{32}P 標識 ds-21、-25 プローブ溶液とした。プローブ溶液は 10 fmol/ μl になるように調整し、実験に用いるまで -80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。標識せずに 5'末端のリン酸化反応を行う場合には、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP の代わりに最終濃度が 1 mM となるように ATP を加えた。

4) ゲルシフトアッセイ

1) で精製した P50 と 3) で ^{32}P 標識した ds-21、ds-25、ss-21 または ss-25 プローブを用いたゲルシフトアッセイを以下の手順で行った。

1 μl の P50 タンパク質溶液 (0-1000 ng)、1 μl の RNA プローブ (10 fmol)、2 μl の 5 \times ゲルシフト緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM NaCl、5 mM EDTA、5 mM DTT、25% グリセロール]、6 μl の滅菌水を加えて混合し、22 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間インキュベートした。反応液に 1 μl の 10 \times ローディング緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、50%グリセロール、0.1% BPB) を加え混合後、Novex 6% レタデーションゲル (Invitrogen 社) を用いてポリアクリルアミドゲル電気泳動 (200V、25 分間) した。泳動緩衝液には 0.5 \times TBE を用いた。泳動終了後のゲルを固定液 (12% メタノール、10% 酢酸) に 10 分間浸し、3MM のろ紙 (Wattman 社) の上に乗せ、ゲルドライヤー (ATTO 社) で乾燥させた (80 $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間)。

乾燥したゲルはX線フィルムに -80°C で1日から7日間露光し、現像した。

コンペティションアッセイを行う場合には、500 ng の P50 と 10 fmol の ^{32}P 標識 RNA プローブを含む溶液に、標識していない RNA (100、200、400 または 800 fmol) を加えて同様に反応を行った。

(5) アグロインフィルトレーション

アグロバクテリウムへの Ti プラスミドの導入、培養およびインフィルトレーションは 2-1- (4) に記載した方法で行った。アグロバクテリウム懸濁液の濃度は $\text{OD}_{600}=1.0$ に調整し、2 種のアグロバクテリウムを同時にインフィルトレーションする場合は、インフィルトレーションする直前に各懸濁液を等量混合した。

(6) GFP 蛍光観察

mGFP の蛍光観察および撮影は 3-1- (4) の方法で行った

(7) イムノブロット分析

P50 タンパク質の葉組織からの検出は 2-1- (6) に記載した方法で行った。

2. 結果

(1) 欠失型 P50 変異体のシステミックサイレンシング抑制能

P50 のシステミックサイレンシング抑制能に関与するアミノ酸領域を調べるため、一連の欠失型 P50 変異体[第 22 図;pBE2113-P50 Δ A (Δ A)、pBE2113-P50 Δ B (Δ B)、pBE2113-P50 Δ C (Δ C)、pBE2113-P50 Δ D (Δ D)、pBE2113-P50 Δ E (Δ E)、pBE2113-P50 Δ F (Δ F) および pBE2113-P50 Δ G (Δ G)] を用いてアグロインフィルトレーションアッセイを行い、GFP-plant でのシステミックサイレンシング抑制能を調べた。ポジティブコントロールには pBE2113-P50 (P50)、ネガティブコントロールには pBE2113-P35T (vector) を用いた。pBI-GFP (GFP) と P50、 Δ A、 Δ B または Δ C を共にインフィルトレーションした個体では、半分以上の個体でシステミックサイレンシングが抑制されたが、GFP と vector、 Δ D、 Δ E、 Δ F または Δ G の場合では抑制効果はほとんど認められなかった (第 5 表)。これらの欠失型 P50 変異体が植物細胞内で蓄積するか調べるため、インフィルトレーションした葉組織を用いてイムノブロット分析を行ったところ、全ての変異体でタンパク質の蓄積が確認された (第 25 図)。以上の結果から、P50 のシステミックサイレンシング抑制能には N 末端側の 37–284 アミノ酸を含む領域が必要であると考えられた。

(2) P50 発現植物でのサイレンシングシグナル移行の阻害

サイレンシングシグナルは原形質連絡 (プラズモデスマータ) を通って細胞間移行し、その後篩管を經由して組織間移行し植物個体全身に広がる (65、61、90、91)。P50 がサイレンシングシグナルの組織間移行を阻害することは第 3 章で報告した。本研究ではさらに第 24 図に示したように P50-plant と GFP-plant を用いた接木試験を行った。P50-plant はイムノブロット分析で展開葉および茎



第 25 図. 欠失型 P50 変異体をアグロインフィльтраーシヨンした
N. benthamiana 葉から抽出した全タンパク質の P50 抗血清を
 用いたイムノブロット分析

インフィльтраーシヨン後 2 日目の葉組織を用いた。図中のアスタリ
 スクは野生型および欠失型 P50 の位置を示している。

第5表. *N. benthamiana* line16cでのアグロインフィルトレーションアッセイにおける欠失型P50変異体のシステミックサイレンシング抑制効果

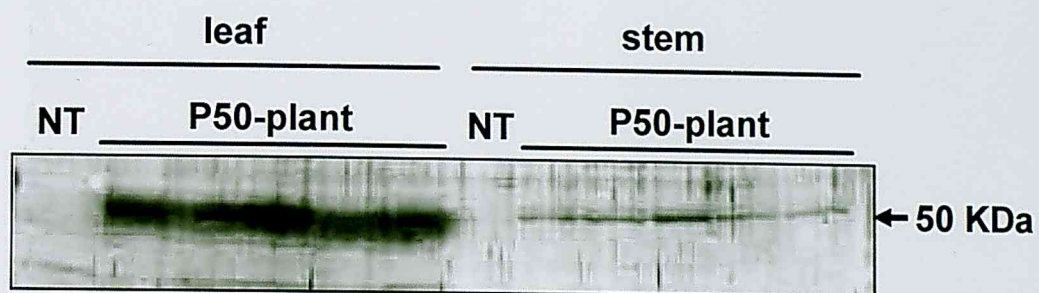
Tiプラスミド コンストラクト	インフィルトレー ションした個体数	サイレンシングが 観察された個体数 ^a	抑制効果 (%)
GFP+Vector	23	21	8.7
GFP+P50	23	8	65.2
GFP+ΔA	23	9	60.9
GFP+ΔB	23	10	56.5
GFP+ΔC	23	10	56.5
GFP+ΔD	23	19	17.4
GFP+ΔE	23	20	13.0
GFP+ΔF	23	23	0.0
GFP+ΔG	23	22	4.3

a インフィルトレーション後14日目にシステミックサイレンシングが誘導されている個体を計数した。

で P50 タンパク質が発現している個体を選抜し、実験に用いた（第 26 図）。

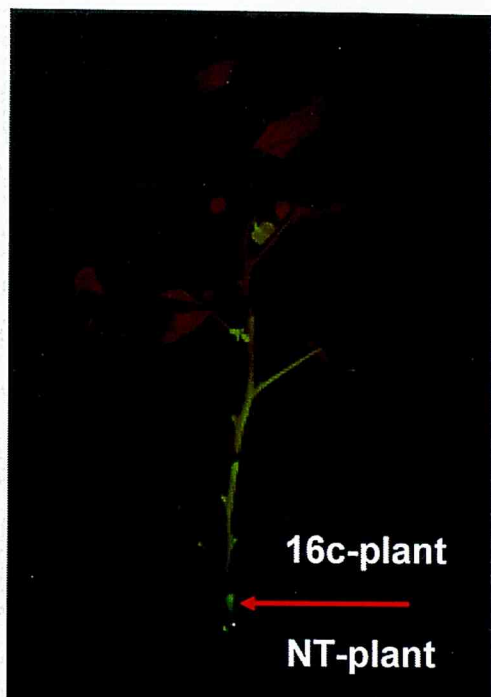
P50-plant あるいは NT-plant を台木とし、GFP-plant を穂木として接木した個体を作製し、台木の展開葉に GFP+pBI-dsGFP (dsGFP) をアグロインフィルトレーションし、サイレンシングを誘導した。インフィルトレーション後 6 週間で、NT-plant を台木にした場合では 14 個体中 12 個体で穂木での GFP 遺伝子のサイレンシングが観察された（第 27 図 A、第 6 表）。一方、P50 を台木にした場合では 18 個体中 7 個体でシステミックサイレンシングが観察され、残りの 11 個体ではサイレンシングは観察されなかった（第 27 図 B、第 6 表）。これらの結果から、P50 は接木によるサイレンシングシグナルの台木から穂木への移行を阻害することが示された。

次に、P50 がサイレンシングシグナルの師管を利用した組織間移行を阻害するか解析した。GFP-plant を台木とし、P50-plant あるいは NT-plant の茎を中間台として接木し、さらにその中間台の上に GFP-plant を穂木として接木した。台木の展開葉に GFP+dsGFP をアグロインフィルトレーションし、サイレンシングを誘導した。インフィルトレーション後 6 週間で穂木の GFP 蛍光を観察したところ、NT-plant を中間台として用いた場合では、11 個体中 9 個体で GFP 蛍光の消失が観察されたのに対し（第 28 図 A、第 6 表）、P50-plant を中間台とした場合ではサイレンシングが誘導されたのは 10 個体中 4 個体で、残りの 6 個体ではサイレンシングが阻害された（第 28 図 B、第 6 表）。これらの結果は、P50 がサイレンシングシグナルの組織間移行を阻害することを強く示唆するものである。



第 26 図. P50 発現 *N. benthamiana* (P50-plant) の葉組織および茎から抽出した全タンパク質の P50 抗血清を用いたイムノブロット分析

T2 世代の P50 発現が確認された個体のうち 5 個体を示している。ネガティブコントロールとして非形質転換体 (NT-plant) を用いた。矢印は P50 の位置を示している。

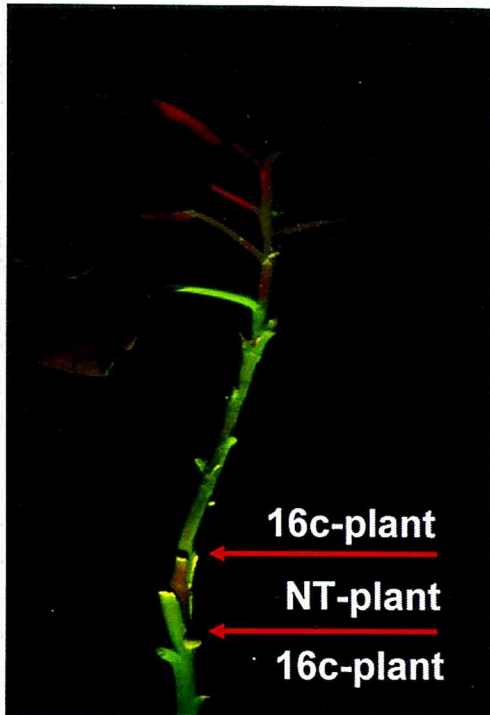
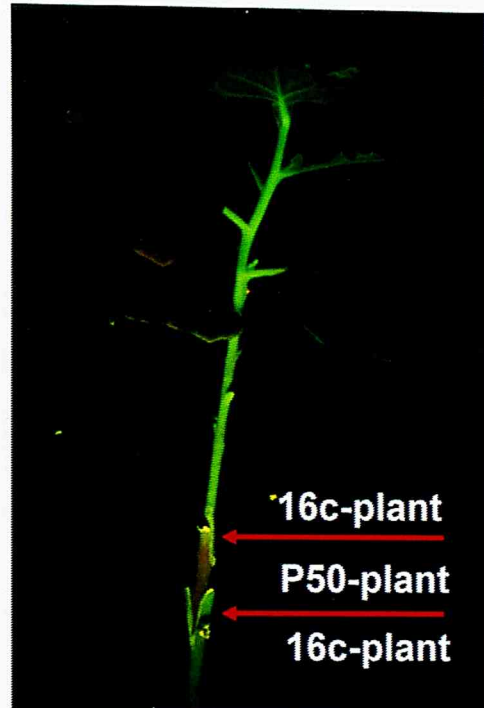
A**B**

第 27 図. P50-plant または NT-plant を台木として用いた接木個体の GFP 蛍光観察像

A : GFP-plant (穂木) / NT-plant (台木)

B : GFP-plant (穂木) / P50-plant (台木)

第 24 図 A に示した接木試験を行った。台木の展開葉にアグロインフィルトレーションで GFP のサイレンシンシング誘導後 6 週間目に UV 照射下で GFP 蛍光観察像を撮影した。矢印は接木の接合部を示している。

A**B**

第 28 図. P50-plant または NT-plant を中間台木として用いた接木個体の GFP 蛍光観察像

A : GFP-plant (穂木) / NT-plant (中間台木) / GFP-plant (台木)

B : GFP-plant (穂木) / P50-plant (中間台木) / GFP-plant (台木)

第 24 図 B に示した接木試験を行った。台木の展開葉にアグロインフィルトレーションで GFP のサイレンシンシング誘導後 6 週間目に UV 照射下で GFP 蛍光観察像を撮影した。矢印は接木の接合部を示している。

第6表. P50-plantを台木または中間台木として用いた場合のシステミックサイレンシング抑制効果

台木/穂木 or 台木/中間台/穂木	インフィルトレーションした 個体数	サイレンシング が観察された 個体数 ^a	抑制効果 (%)
NT-plant / GFP-plant	14	12	14.3
P50-plant / GFP-plant	18	7	61.1
GFP-plant / NT-plant / GFP-plant	11	9	18.2
GFP-plant / P50-plant / GFP-plant	10	4	60

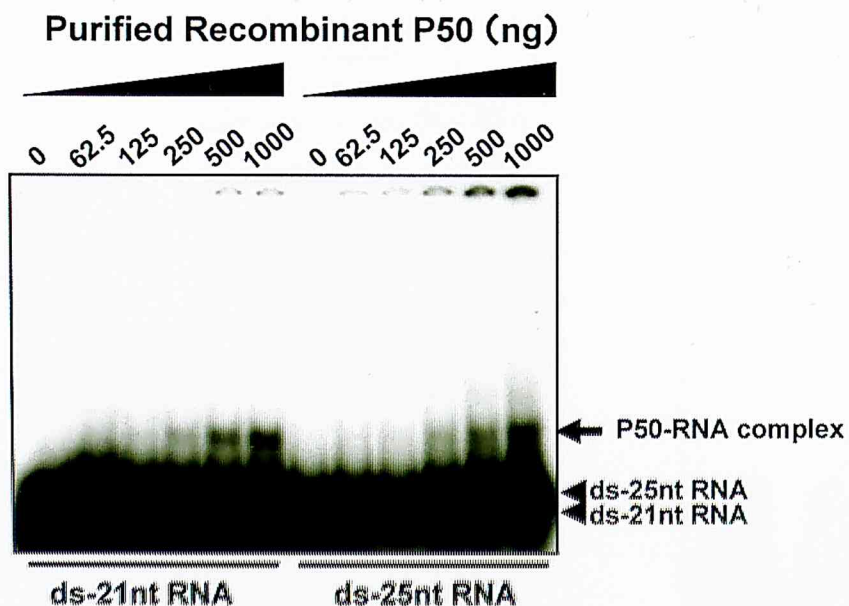
a インフィルトレーション後6週間目に穂木でシステミックサイレンシングが誘導されている個体を計数した。

(3) P50 の RNA 結合特性

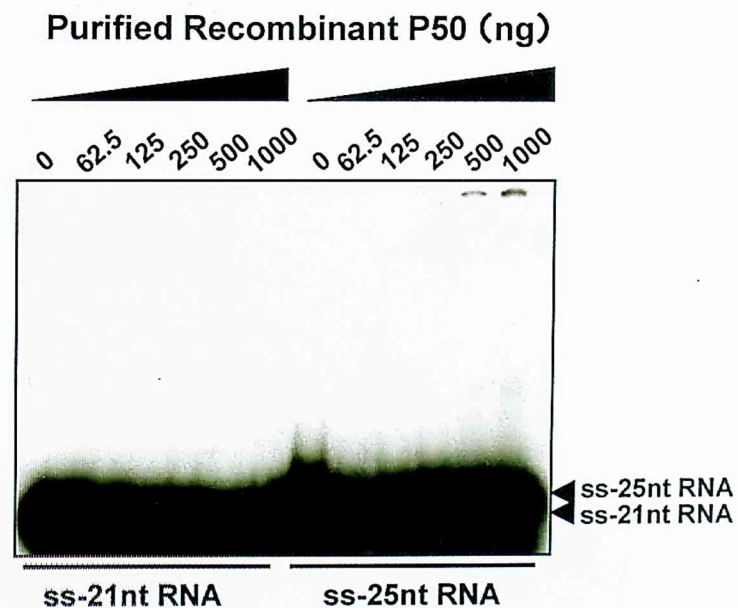
これまでに報告されている植物ウイルスのサイレンシングサプレッサーの多くは siRNA や二本鎖 RNA (dsRNA) 結合能を有しており、この dsRNA 結合能はサプレッサーの共通の機能であることが示唆されている (47、59)。P50 に siRNA や dsRNA 結合能があるか明らかにするため、大腸菌を用いて発現した P50 と $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 標識した合成 RNA プローブ (ds-21、ds-25、ss-21、ss-25) を用いたゲルシフトアッセイを行った。

まず、P50 タンパク質量を段階的に増加 (0、62.5、125、250、500、1000 ng) させ、ds-21 および ds-25 (いずれも 10 fmol) と結合するか調べた。その結果、ds-21 または ds-25 のどちらの場合でも P50 タンパク質を加えない場合 (0 ng) では、フリーdsRNA のシグナルのみ検出されたが、P50 タンパク質を加えるとフリーdsRNA より移動度が遅いシグナルが検出され、そのシグナル強度はタンパク質量に比例して増加した (第 29 図 A)。この結果から移動度が遅延したシグナルは P50-RNA 複合体のシグナルだと考えられた。また、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 標識した 21 および 25 塩基の一本鎖 RNA (ss-21、-25) をプローブとしてゲルシフトアッセイを行ったが、P50 タンパク質量が 62.5–1000 ng の場合で P50-RNA 複合体のシグナルは得られなかった (第 29 図 B)。P50 と ds-21 および ds-25 の結合が特異的であるか調べるため、非標識の ds-21、ds-25、ss-21、ss-25 および ds-400 を用いたコンペティションアッセイを行った。P50 は 500 ng、プローブは ds-25 (10 fmol) とし、100、200、400 あるいは 800 fmol の非標識 RNA をコンペティターとして用いた。ss-21 および ss-25 をコンペティターRNA として加えた場合では、800 fmol (80 倍) 加えても P50-RNA 複合体のシグナル強度に影響しなかった (第 30 図 A)。一方で ds-21、ds-25 および ds-400 をコンペティタ

A



B

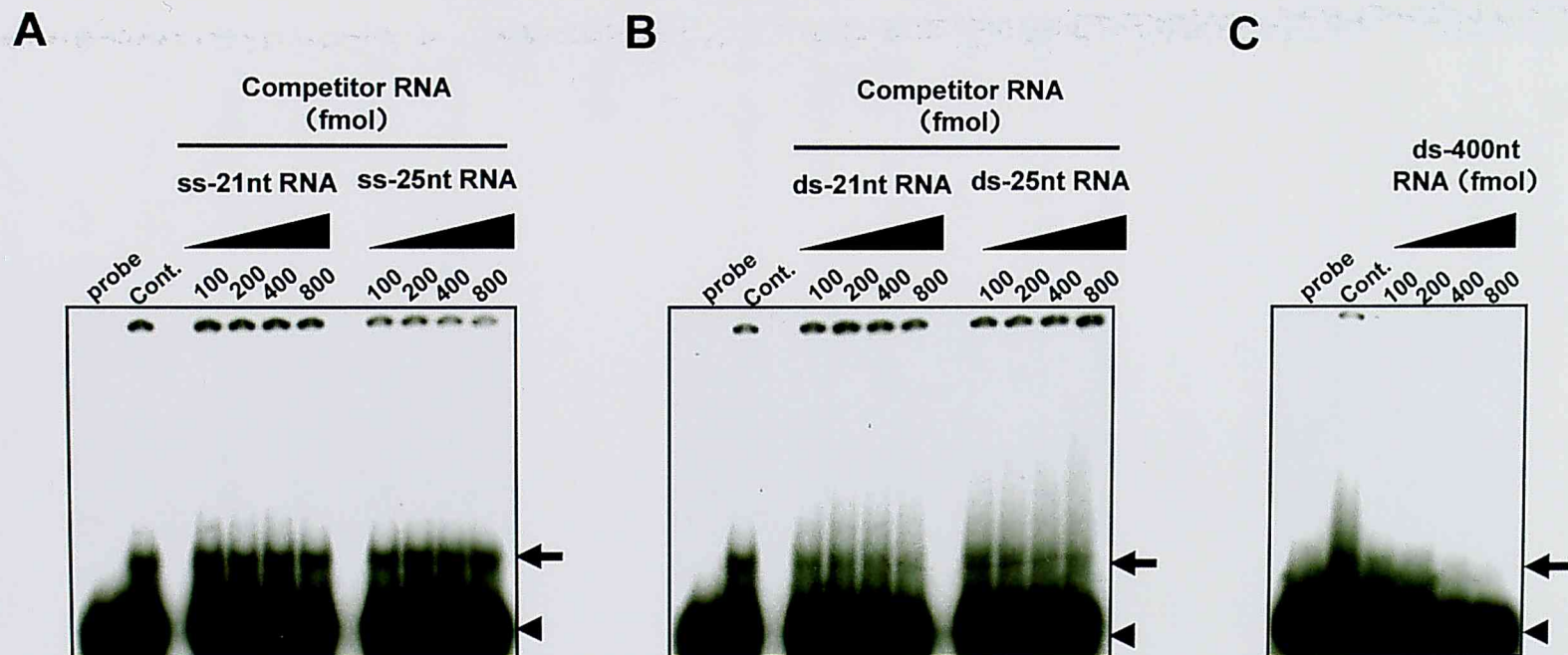


第29図. 大腸菌で発現したP50と合成siRNAプローブを用いたゲルシフトアッセイ

A: プローブRNAとして二本鎖RNA (ds-21nt RNAまたはds-25nt RNA) を用いた

B: プローブRNAとして一本鎖RNA (ss-21nt RNAまたはss-25nt RNA) を用いた

P50は62.5から1000ng、プローブRNAは10fmolを用いた。矢印はP50とプローブRNA複合体、矢じり形の印はプローブRNAの位置を示している。



第30図. 大腸菌で発現したP50とds-25nt RNAプローブにコンペティターRNAを加えたコンペティションアッセイ

- A : コンペティターとして100から800 fmolの一本鎖RNA (ss-21nt RNAまたはss-25nt RNA) を用いた
 B : コンペティターとして100から800 fmolの二本鎖RNA (ds-21nt RNAまたはds-25nt RNA) を用いた
 C : コンペティターとして100から800 fmolの二本鎖RNA (ds-400nt RNA) を用いた。

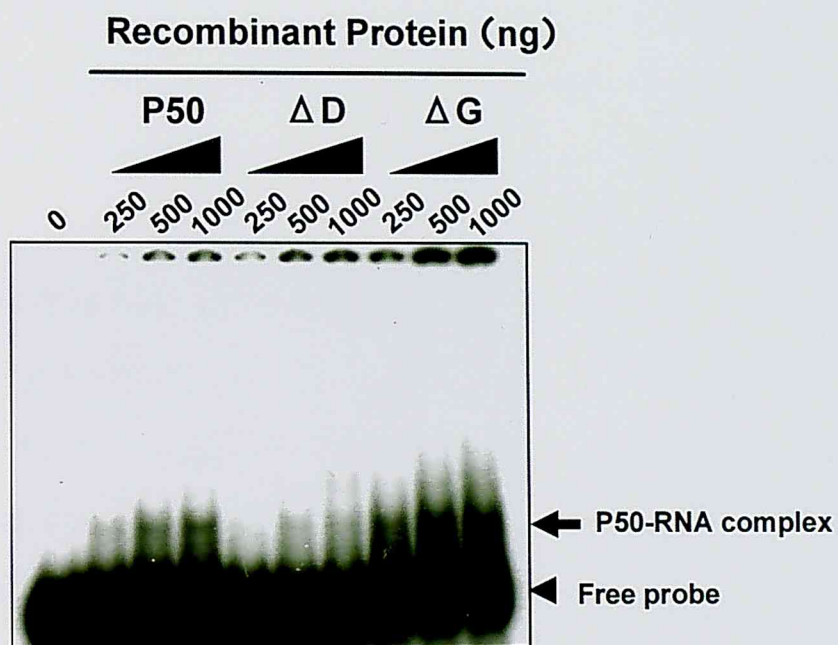
組み換えP50は500ng、プローブRNA (ds-25nt RNA) は10fmolを用いた。Probe : プローブRNAのみ、
 Cont : 500 ngのP50とプローブRNA。矢印はP50とプローブRNA複合体、矢じり形の印はプローブRNAの
 位置を示している。

ーとして加えた場合では、コンペティターの量が増加すると、P50-RNA 複合体のシグナル強度が低下した（第 30 図 B、C）。以上の結果から、P50 は試験管内でサイズ非特異的に siRNA を含む二本鎖 RNA に結合することが示された。

P50 の核酸結合ドメインは二箇所（82–125 アミノ酸と 126–276 アミノ酸）にマッピングされている（38）。P50 の二本鎖 RNA 結合にはこの二箇所の核酸結合ドメインのうちどちらが関与しているか調べるため、二種の欠失型 P50 変異体 [ΔD（216–284 アミノ酸を欠失）、ΔG（37–124 アミノ酸を欠失）] を P50 と同様に大腸菌で発現させ、ds-25 プローブと結合するか調べた。ΔG タンパク質を用いた場合では、タンパク質量に比例して P50-RNA 複合体のシグナル強度が増加し、P50 と ΔG 間でシグナル強度に顕著な差は認められなかったが、ΔD の場合では P50 または ΔG と比較して P50-RNA 複合体のシグナル強度が弱かった（第 31 図）。この結果から、P50 の二箇所の核酸結合ドメインのうち 126–276 アミノ酸の領域が二本鎖 RNA の結合に関与していると考えられた。

3. 考察

本研究では、ACLSV のサイレンシングサプレッサーである P50 がどのようなメカニズムでサイレンシングシグナルの移行を阻害し、システムックサイレンシングを抑制するか明らかにするため、まずは P50 のシステムックサイレンシング抑制に必要なアミノ酸領域の同定を試みた。一連の欠失型 P50 変異体（第 22 図；ΔA、ΔB、ΔC、ΔD、ΔE、ΔF および ΔG）を用いてアグロインフィルトレーションアッセイで解析したところ、P50、ΔA、ΔB または ΔC ではシステムックサイレンシング抑制効果が認められたが、ΔD、ΔE、ΔF または ΔG の場合では抑制効果はほとんど認められなかった（第 5 表）。これらの結果から、P50 の



第 31 図. 大腸菌で発現した P50 および欠失型 P50 変異体 (ΔD と ΔG) と ds-25nt RNA プローブを用いたゲルシフトアッセイ

組み換えタンパク質は 250、500 または 1000ng、プローブ RNA は 10fmol を用いた。矢印は P50 とプローブ RNA 複合体のシグナル、矢じり形の印はプローブ RNA の位置を示している

システミックサイレンシング抑制能には N 末端側の 37-284 アミノ酸を含む領域が重要であることが明らかになった。 ΔA 、 ΔB および ΔC は細胞間移行能の無い変異型 ACLSV-cDNA クローンの感染を相補できることや、野生型 P50 と同様にプラズモデスマータへ局在すること、また細胞間移行能および管状構造誘導能を保持していることが報告されている (80、81)。一方、 ΔD 、 ΔE 、 ΔF および ΔG はそれらの機能が完全に失われている (80、81)。従って、P50 のシステミックサイレンシング抑制には細胞間移行タンパク質としての機能が保持されていることが必要と考えられた。サイレンシングシグナルはプラズモデスマータを通して細胞間移行し、師管を経由して組織間移行することから (65、61、90、91)、P50 のプラズモデスマータへの局在や師管への移行と蓄積が重要かもしれない。イムノブロット分析により本研究で供試した欠失型 P50 変異体はシグナルに差があるものの、植物細胞内で蓄積することが確認された (第 25 図)。このシグナル強度の差は、蓄積レベルが異なるためか、あるいは抗原性の差なのかは不明である。

P50 がサイレンシングシグナルの組織間移行を阻害するかを明らかにするため P50 発現 *N. benthamiana* (P50-plant; 第 26 図) と GFP 発現 *N. benthamiana* line16c (GFP-plant) を用いた接木試験を行ったところ (第 24 図)、P50 を台木として用いた場合 (第 24 図 A) と中間台木として用いた場合 (第 24 図 B) のいずれにおいても、非形質転換体 (NT-plant) を用いたコントロールと比較して穂木でのシステミックサイレンシング抑制効果が認められた (第 27、28 図、第 6 表)。これらの結果から、P50 は師管内でサイレンシングシグナルの移行を阻害することが示唆された。接木試験での P50 のシステミックサイレンシング抑制効率は不完全であり (約 60%)、アグロインフィルトレーションによる一過性発現の場合と同様の結果となった。本研究で用いた P50-plant はホモ化されていない世代

であるため、P50 の発現量が影響しているのかもしれない。あるいは、P50 の作用機構では完全にサイレンシングシグナル移行を阻害できない可能性も考えられる。

P50 と同様に CMV-2b もまた師管でサイレンシングシグナルの組織間移行を阻害することが報告されている (27)。これに加えて CMV-2b はサイレンシング抑制のために様々な機能を持っている：1) シロイヌナズナの RNA サイレncing誘導タンパク質複合体 (RISC) の重要な構成因子の一つである Argonaute1 タンパク質に直接相互作用し、その RNA 切断活性を阻害する (108)；2) siRNA を含む二本鎖 RNA 結合能を持ち、その能力が失われた変異体ではローカルおよびシステミックサイレンシング抑制能が低下する (26)；サリチル酸により発現誘導されるシロイヌナズナの RNA-dependent-RNA polymerase 1 (RdR1) 依存性の CMV 特異的 siRNA 産生を阻害する (19)。しかしながら、これらのどの機能がサイレンシングシグナルの組織間移行の阻害に関与するかは明らかではない。多くのサイレンシングサプレッサーは siRNA や二本鎖 RNA と結合能を持つことから、siRNA や二本鎖 RNA への結合がサプレッサーの共通の機能であることが示唆されている (47、59)。そこで、P50 がこれらの RNA に結合できるか調べるため、大腸菌で発現した P50 と合成 siRNA および二本鎖 RNA を用いたゲルシフトアッセイで試験管内での結合能を解析した。その結果、P50 は 21 および 25 塩基の合成二本鎖 siRNA に結合するが (第 29 図 A)、一本鎖の合成 siRNA には結合しないことが示された (第 29 図 B)。さらに、コンペティションアッセイにより 400 塩基の二本鎖 RNA にも結合することが明らかとなった (第 30 図 C)。これらの結果から、P50 はサイズ非特異的な二本鎖 RNA 結合能を持つことが示された。これまでに報告されている siRNA 結合能を持つサプレッサーは細胞内で siRNA と結合することで、標的 mRNA の分解を防ぐと考えられる (13、47)。

P50 はこれらのサプレッサーと同様に siRNA および二本鎖 RNA 結合能を持つが、細胞内でのサイレンシングは抑制しない（第 13、14 図）。この違いは P50 の細胞内局在（細胞質表層およびプラズマデスマータに局在）と関連しているかもしれない。

P50 の二箇所の核酸結合ドメイン [ドメイン A (82–125 アミノ酸) とドメイン B (126–276 アミノ酸) ; 38) のうちどちらが二本鎖 RNA 結合に関与するか調べるため、二種の欠失型 P50 変異体 [Δ D (216–284 アミノ酸を欠失)、 Δ G (37–124 アミノ酸を欠失)] を用いて解析したところ、ドメイン B の 216–276 アミノ酸の領域が二本鎖 RNA の結合に関与することが示された（第 31 図）。この 2 箇所のドメインの核酸結合能の違いは、P50 がドメイン A でウイルスゲノムへ、ドメイン B でサイレンシングシグナルへ結合することを意味しているのかもしれない。これまでに報告されている多くのサイレンシングサプレッサーは siRNA または二本鎖 RNA 結合能を持つことから (13、45、46、47、59、87)、P50 の二本鎖 RNA 結合能もまたサイレンシング抑制に重要な役割を果たしていると考えられる。今後、P50 が植物細胞内で siRNA あるいは二本鎖 RNA に結合するか明らかにする必要があるだろう。

第5章 総合考察

わが国のリンゴに感染している ACLSV は CP アミノ酸配列に基づいた系統解析で 2 つのタイプ (P205 タイプと B6 タイプ) に区別できることが明らかになった (第 1 図)。また、2 つのタイプ間で 40、59、75、130 および 184 番の 5 箇所のアミノ酸は連動して変異している (第 2 図)。この 5 箇所のアミノ酸のうち 40 番と 75 番の組み合わせ (アラニンとフェニルアラニンまたはセリンとチロシン) が草本宿主に対する感染性に重要である (97)。すなわち、CP は粒子形成の役割以外にウイルスの細胞レベルでの増殖あるいは細胞間移行に関与する可能性が考えられた。そこで本研究では、感染性の消失した変異体を解析することで、CP の未知の機能を明らかにしようとした。まず、Ti プラスミドを基にした感染性 cDNA クローン (pBICLSF) を構築し、アグロバクテリウムを介したウイルス接種系を確立した。pBICLSF のアグロインフィルトレーション法による接種では、100% の感染率を示し、さらにインフィルトレーションした組織の多数の細胞で同調した感染を誘導できるため、プロトプラストを用いた実験系と同様に細胞レベルでのウイルス増殖能の解析できる (第 6 図)。本研究で確立した pBICLSF のアグロバクテリウムを介した接種法は、効率的なウイルス接種法が確立されていない果樹への接種にも応用できるかもしれない。

pBICLSF を基に CP の 40 番と 75 番のアミノ酸をそれぞれ一方のみにアミノ酸置換 (アラニンからセリンまたはチロシンからフェニルアラニン) を導入した変異体 (pBICLCPm40 および pBICLCPm75) を作製し (第 4 図)、細胞レベルでの増殖能を調べたところ、ウイルスゲノム RNA、複製型二本鎖 RNA およびウイルスタンパク質 (MP と CP) の蓄積が著しく低下した。一方、40 番と 75 番両方のアミノ酸を置換した変異体 (pBICLCPm40m75) は野生型 (pBICLSF) のそ

れらと同レベルであった（第 6、7 図）。すなわち、この 2 箇所のアミノ酸の組み合わせが効率的なウイルス複製に重要であると考えられた。これまでに報告された ACLSV の 12 分離株およびリンゴ樹から直接 RT-PCR で増幅した cDNA クローンにおいては、CP アミノ酸番号 40、59、75、130 および 184 番の 5 箇所のアミノ酸の組み合わせは P205 および B6 タイプのどちらかに保存されているが、本研究の逆遺伝学的な解析から、40 番と 75 番のアミノ酸の組み合わせが重要であることが証明された。一方、59、130 および 184 番は遺伝的浮動により 2 つのタイプに分かれたことが示唆された。40 番と 75 番のアミノ酸の組み合わせがなぜ 2 つのタイプ存在するのか明らかではないが、2 種のカルモウイルスで報告されているように宿主適応と関連するかもしれない（50、69）。今後、この 2 箇所のアミノ酸の組み合わせが果樹での増殖能あるいは病原性などに関与するか明らかにする必要があるだろう。

変異型 CP タンパク質（CPm40、CPm75 および CPm40m75）のアグロインフイルトレーションによる一過性発現試験では、CP の 40 番と 75 番のアミノ酸の組み合わせは CP タンパク質の *N. occidentalis* での安定性に影響することが明らかとなった（第 8 図）。この結果から、CP 変異型 cDNA クローン（pBICLCPm40、pBICLCPm75）の感染性の消失は、変異型 CP タンパク質が合成されても植物細胞内で安定に蓄積しないため、粒子形成および複製を効率的に行うことができず、単細胞での増殖が抑制されるのが原因と考えられた。そこで、pBICLCPm40 または pBICLCPm75 の増殖が野生型 CP の一過的な共発現で相補されるか解析したところ、pBICLCPm40 および pBICLCPm75 の複製は相補されず、そればかりでなく pBICLSF のゲノム RNA 蓄積が阻害された（第 9 図 A）。このゲノム RNA 蓄積阻害は CP タンパク質の発現により誘導されることから（第 9 図 B）、CP はその発現量あるいは発現するタイミングによってはウイルス複製に対して阻害

的に働くことが示唆された。CP タンパク質の過剰発現による、ゲノム RNA 蓄積阻害がどのようにして引き起こされるのかは明らかではないが、この現象を解明することで、CP のウイルス複製における機能を知ることができるかもしれない。CP は粒子形成する以外に、ウイルス複製、病徴発現、細胞間移行、長距離移行および RNA サイレンシングの抑制などの様々な機能を持つことが他のウイルス種で報告されている (9、10、15、52、67、84)。本研究においては ACLSV-CP がウイルス複製の効率にも重要な機能を持つことを明らかにした。CP がウイルス複製に関与する例はアルファモウイルス属のアルファルファモザイクウイルス (*Alfalfa mosaic virus* ; AMV) およびイラルウイルス属で報告されているのみである。これらのウイルスは、ゲノム RNA に加えてわずかな CP タンパク質あるいは CP サブゲノム RNA を感染に必要とし (5、6)、CP がゲノム RNA の 3' 末端非翻訳領域に結合することがウイルス複製に必須である (28、43、63)。ACLSV においても CP とウイルスゲノム RNA との相互作用がゲノムの複製にとって重要なかもしれない。

植物ウイルスが宿主植物に感染すると、ウイルスに対する基礎的防御機構である RNA サイレンシングの標的となる (3、20、86、89、96)。多くのウイルスはこの RNA サイレンシングを回避し、効率的に全身感染するため、サイレンシングサプレッサーをコードしている (72、93)。本研究では、ACLSV のコードするどの遺伝子が RNA サイレンシングサプレッサー活性を有するかを *N. benthamiana* line16c (GFP-plant) を用いたアグロインフィльтраーションアッセイで解析した。その結果、ACLSV のコードする 3 種のタンパク質 (P216、P50 および CP) のうち P50 が、インフィльтраーションした細胞内で引き起こされるローカルサイレンシングには影響しないが、サイレンシングシグナルの移行により引き起こされるシステミックサイレンシングを抑制した (第 13-17 図、第

1 表)。P50 は一本鎖および二本鎖 RNA のどちらでサイレンシングを誘導した場合でもシステミックサイレンシングの阻害効果を示し (第 1 表)、二種の siRNA 蓄積に影響しなかった (第 18 図)。また、P50 がサイレンシングシグナルの産生と移行のどちらを阻害するか調べるため、P50 を GFP-plant の展開葉の基部に発現させ、同じ葉の先端部で GFP のサイレンシングを誘導したところ、システミックサイレンシングが阻害されたことから (第 2 表)、P50 はサイレンシングシグナルの産生よりはむしろ移行を阻害することが強く示唆された。ACLSV と同様に果樹を宿主とする ALSV についてもサイレンシングサプレッサーの解析を行ったところ、ALSV-RNA2 にコードされる 3 種の外被タンパク質 (Vp25、Vp24 および Vp20) のうち Vp20 がサイレンシングサプレッサー活性を持ち、P50 と同様にサイレンシングシグナルの移行を阻害することでシステミックサイレンシングを抑制することを明らかにした (第 19-22 図、第 3、4 表)。P50 および Vp20 のようにシステミックサイレンシングを特異的に阻害するサプレッサーの報告例は少ない。カンキツトリステザウイルス (*Citrus tristeza virus* ; CTV) の CP と *Rice yellow mottle virus* (RYMV) の P1 タンパク質のみである (30、33、52)。RYMV-P1 は長鎖 siRNA (24-26nt) の蓄積を阻害するが、CTV-CP は P50 や Vp20 と同様にローカルサイレンシングにはほとんど影響せずにシステミックサイレンシングを抑制する。ACLSV-P50 は細胞間移行タンパク質、ALSV-Vp20 と CTV-CP は外被タンパク質と機能的には全く異なるタンパク質であるにも関わらず、サイレンシングサプレッサーとしての性質は類似している点は非常に興味深い。さらに、ACLSV、ALSV および CTV はいずれも永年性果樹を宿主とするウイルスである。システミックサイレンシングを特異的に阻害する機能を持ったサプレッサーは果樹での持続的感染に重要なものかもしれない。今後、ACLSV および ALSV の果樹での感染、増殖過程の特徴とシステミックサイレンシング

を特異的に阻害する P50 および Vp20 の機能との関連性を明らかにする必要があるだろう。

ACLSV 感染性 cDNA クローン (pBICLSF) と GFP をアグロインフィルトレーションで *N. occidentalis* に共発現させても GFP 遺伝子のローカルサイレンシングは抑制されなかった。また、外来遺伝子 (GFP) および植物の内在性遺伝子配列を組み込んだ ALSV は、感染細胞で効率的に標的遺伝子のサイレンシングを誘導する (35、98、100)。これらのことは、ACLSV および ALSV は細胞内で誘導されるローカルサイレンシングを積極的に抑制しないことを示唆しており、サイレンシングサプレッサーの性質とも一致する。したがって、これらのウイルスはサイレンシングサプレッサーでサイレンシングを抑制する手段のほかに、何らかのサイレンシング回避機構を備えていることが考えられる。ALSV においては、サイレンシングが誘導されている細胞であっても、ウイルスゲノムおよび外被タンパク質が検出されるが、ウイルスゲノム由来の siRNA は検出されないことから速やかにウイルス粒子化することでゲノム RNA を保護しているのではないかと推測されている (100)。あるいは、土壌伝染性ウイルスであるビートネソ性葉脈黄化ウイルス (*Beet necrotic yellow vein virus*; BNYVV) やタバコ茎えそウイルス (*Tobacco rattle virus*; TRV) では、根特異的なサイレンシング抑制能があることが報告されていることから (68)、ACLSV および ALSV にも組織特異的なローカルサイレンシング抑制活性があるのかもしれない。

ACLSV のサイレンシングサプレッサーである P50 がどのようなメカニズムでサイレンシングシグナルの移行を阻害するのか明らかにするため、まずは P50 のシステミックサイレンシング抑制に必要なアミノ酸領域の同定を試みた。一連の欠失型 P50 変異体 (第 22 図; ΔA 、 ΔB 、 ΔC 、 ΔD 、 ΔE 、 ΔF および ΔG) を用いてアグロインフィルトレーションアッセイで解析したところ、P50、 ΔA 、 ΔB

および ΔC ではシステミックサイレンシング抑制効果が認められたが、 ΔD 、 ΔE 、 ΔF および ΔG の場合では抑制効果は認められなかった(第5表)。この結果から、P50 のシステミックサイレンシング抑制能には N 末端側の 37-284 アミノ酸を含む領域が重要であることが示された。 ΔA 、 ΔB および ΔC は細胞間移行能の無い変異型 ACLSV-cDNA クローンの感染を相補でき、野生型 P50 と同様にプラズモデスマータへの局在、細胞間移行能および管状構造誘導能を保持しているが、 ΔD 、 ΔE 、 ΔF および ΔG は細胞内でそれらの機能が完全に失われる (37、80、81)。従って、P50 のシステミックサイレンシング抑制と細胞間移行タンパク質としての機能は密接に関連しているのかもしれない。

P50 がサイレンシングシグナルの組織間移行を阻害するか明らかにするため、P50 発現 *N. benthamiana* (P50-plant ; 第 26 図) と GFP-plant を用いた接木試験を行ったところ (第 24 図)、P50 を台木として用いた場合 (第 24 図 A) と中間台木として用いた場合 (第 24 図 B) のいずれにおいても、穂木でのシステミックサイレンシング抑制効果が認められた (第 27、28 図、第 6 表)。この結果は P50 が師管でサイレンシングシグナルの組織間移行を阻害することが強く示唆している。

サイレンシングシグナルの細胞間移行と組織間移行は異なる分子が関与すると考えられており (61、90)、細胞間移行には 21 から 22 塩基の短鎖 siRNA がシグナル分子を構成する重要な因子である (21、30、33)。一方、組織間移行には 24-25 塩基の長鎖 siRNA が関与するという報告と (30、33)、siRNA 以外の核酸分子が関与する報告がされているが (8、56、57)、未だ不明な点が多い。P50 はサイレンシングシグナルの移行経路であるプラズモデスマータおよび師管に局在または蓄積することから (80、81、104)、P50 がサイレンシングシグナル分子に直接結合して移行を阻害しているのではないかと考え、P50 の RNA 結合能を

ゲルシフトアッセイで解析した。その結果、P50 はサイズ非特異的な二本鎖 RNA 結合能を持つことが示された（第 29、30 図）。この結果は siRNA および二本鎖 RNA がサイレンシングシグナル分子であることを示しているのかもしれない。また、P50 の二箇所の核酸結合ドメイン [ドメイン A (82–125 アミノ酸) とドメイン B (126–276 アミノ酸) ; 38) のうちドメイン B の 216–276 アミノ酸の領域が二本鎖 RNA の結合に強く働いていることが示された（第 31 図）。この 2 箇所の核酸結合ドメインは、ウイルスゲノム RNA とサイレンシングシグナル分子という二つの標的へ結合するためにその結合特性が異なるのかもしれない。ドメイン B の二本鎖 RNA 結合能がサイレンシングシグナル移行阻害に関与するか調べる必要があるだろう。

本研究では ACLSV の CP と P50 が複数の機能を有する多機能性タンパク質であることを明らかにした。すなわち CP は粒子形成と効率的な複製に関与し、P50 は細胞間移行タンパク質としての機能に加えてサイレンシングサプレッサーとして働く。これらの機能はどちらのタンパク質でも本来の機能と密接に関連しており、ウイルスの効率的な感染をサポートする機能である。ACLSV はバラ科の果樹に広く感染し、世界中の果樹に広く分布している (51、102)。本研究で明らかにした CP と P50 の多機能性は ACLSV が果樹に適応するために進化してきた結果なのかもしれない。本研究で得られた知見が今後の果樹ウイルス病の効率的な防除法を講じる上で役立つことを期待したい。

摘要

本研究ではリンゴクロロティックリーフスポットウイルス (ACLSV) の外被タンパク質 (CP) と細胞間移行タンパク質 (P50) の多機能性を明らかにする目的で、1) リンゴクロロティックリーフスポットウイルス外被タンパク質 (ACLSV-CP) のアミノ酸変異の解析、2) ACLSV とリンゴ小球形潜在ウイルス (ALSV) の RNA サイレンシングサプレッサーの同定、3) ACLSV-P50 のシステミックサイレンシング抑制機構の解析を行った。結果は以下のように要約される。

1. リンゴクロロティックリーフスポットウイルス外被タンパク質 (ACLSV-CP) のアミノ酸変異の解析

(1) Ti プラスミドを基にした ACLSV 感染性 cDNA クローン (pBICLSF) を構築し、アグロバクテリウムを介したウイルス接種系を確立した。本法による接種では、インフィルトレーションした組織の多数の細胞で同調した感染を誘導できるため、プロトプラストを用いた実験系と同様に細胞レベルでのウイルス増殖能の解析が可能となった。

(2) pBICLSF を基に CP の 40 番と 75 番のアミノ酸をそれぞれ一方のみにアミノ酸置換 (アラニンからセリンまたはチロシンからフェニルアラニン) を導入し感染性の消失した変異体 (pBICLCPm40 および pBICLCPm75) を作製し、これらの変異体の細胞レベルでの増殖能を調べた。その結果、これらの変異体はウイルスゲノム RNA、複製型二本鎖 RNA およびウイルスタンパク質 (MP と CP) の蓄積が著しく低下したのに対し、40 番と 75 番両方のアミノ酸を置換した変異体 (pBICLCPm40m75) は野生型 (pBICLSF) のそれらと同レベルであっ

た。以上より、CP の 2 箇所のアミノ酸の組み合わせは効率的なウイルス複製に重要であることが明らかとなった。

(3) 変異型 CP タンパク質 (CPm40、CPm75 および CPm40m75) のアグロインフイルトレーションによる一過性発現試験では、CP の 40 番と 75 番のアミノ酸の組み合わせは CP タンパク質の *N. occidentalis* での安定性に影響することを明らかにした。また、pBICLCPm40 または pBICLCPm75 の増殖が野生型 CP の一過性発現で相補されるか解析したところ、pBICLCPm40 および pBICLCPm75 の複製は相補されず、そればかりでなく pBICLSF のゲノム RNA 蓄積が阻害された。このゲノム RNA 蓄積阻害は CP タンパク質の発現により誘導されることから、CP の蓄積はウイルスの効率的な複製に必須であるが、その発現量あるいは発現のタイミングによっては阻害的に働くことを明らかにした。

2. ACLSV とリンゴ小球形潜在ウイルス (ALSV) の RNA サイレンシング サプレッサーの同定

(1) ACLSV のコードするどの遺伝子に RNA サイレンシングサプレッサー活性があるかを調べるため、*N. benthamiana* line16c (GFP-plant) を用いたアグロインフイルトレーションアッセイで解析した。その結果、ACLSV のコードする 3 種のタンパク質 (P216、P50 および CP) および pBICLSF の発現あるいは感染はインフイルトレーションした細胞で誘導されるローカルサイレンシングを抑制しなかった。一方、P50 タンパク質の発現は上位葉で誘導されるシステムックサイレンシングを特異的に抑制した。P50 は一本鎖、二本鎖 RNA のどちらでシステムックサイレンシングを誘導した場合でも阻害効果を示し、二種の siRNA 蓄積に影響しなかった。

(2) P50 がサイレンシングシグナルの産生と移行のどちらを阻害するか調べる

ため、P50 を GFP-plant の展開葉の基部に発現させ、同じ葉の先端部で GFP のサイレンシングを誘導したところ、システミックサイレンシングを阻害した。以上の結果から、P50 はサイレンシングシグナルの産生よりはむしろ移行を阻害することが明らかとなった。

(3) ACLSV と同様に果樹を宿主とする ALSV についても GFP-plant を用いてサイレンシングサプレッサーの解析を行った。その結果、ALSV-RNA2 にコードされる 3 種の外被タンパク質 (Vp25、Vp24 および Vp20) のうち Vp20 のみがサイレンシングサプレッサー活性を持ち、ローカルサイレンシングにはほとんど影響しないが、サイレンシングシグナルの移行を阻害することでシステミックサイレンシングを抑制することを明らかにした。

3. ACLSV-P50 のシステミックサイレンシング抑制機構の解析

(1) ACLSV のサイレンシングサプレッサーである P50 がどのようなメカニズムでサイレンシングシグナルの移行を阻害するのか明らかにするため、まずは P50 のシステミックサイレンシング抑制に必要なアミノ酸領域の同定を試みた。一連の欠失型 P50 変異体 (ΔA 、 ΔB 、 ΔC 、 ΔD 、 ΔE 、 ΔF および ΔG) にシステミックサイレンシング抑制能があるか調べるため、GFP-plant を用いたアグロインフィルトレーションアッセイで解析したところ、P50、 ΔA 、 ΔB および ΔC ではシステミックサイレンシング抑制効果が認められたが、 ΔD 、 ΔE 、 ΔF および ΔG の場合では抑制効果は認められなかった。この結果から、P50 のシステミックサイレンシング抑制能には N 末端側の 37–284 アミノ酸を含む領域が重要であることが示された。

(2) P50 がサイレンシングシグナルの組織間移行を阻害するか明らかにするため、P50 発現 *N. benthamiana* (P50-plant) を作出し、GFP-plant との接木試験を行

った。まず、P50-plant を台木に、GFP-plant を穂木とした個体と、GFP-plant を台木、P50-plant を中間台、さらに GFP-plant を穂木とした個体を作出し、台木でシステミックサイレンシングを誘導した。その結果、P50-plant を台木あるいは中間台木として用いた場合では、非形質転換体 (NT-plant) を用いたコントロールと比較して穂木でのシステミックサイレンシング抑制効果が認められた。これらの結果から、P50 は師管でサイレンシングシグナルの組織間移行を阻害することが明らかにされた。

(3) これまでに報告されているサイレンシングサプレッサーの多くは siRNA および二本鎖 RNA に結合する。P50 もまたこれらの RNA への結合能があるか解析するため、大腸菌で発現させた P50 と合成 siRNA プローブを用いたゲルシフトアッセイにより核酸結合能を解析した。その結果、P50 は 21、25 塩基の合成 siRNA および 400 塩基の二本鎖 RNA に結合することが明らかになった。以上より、P50 はサイズ非特異的な二本鎖 RNA 結合能を持つと考えられた。また、P50 の二箇所の核酸結合ドメイン [ドメイン A (82–125 アミノ酸) とドメイン B (126–276 アミノ酸)] のうちどちらが二本鎖 RNA 結合に関与するか調べるため、二種の欠失型 P50 変異体 [Δ D (216–284 アミノ酸を欠失)、 Δ G (37–124 アミノ酸を欠失)] を用いて解析したところ、ドメイン B の 216–276 アミノ酸の領域が二本鎖 RNA の結合に強く関与することが示された。

引用文献

1. Alrwahneh, M., Turturo, C., Minafra, A., Saldarelli, P., Myrta, A., Pallas, V. & Savino, V. (2004). Molecular variability of apple chlorotic leaf spot virus in different hosts and geographical regions. *J Plant Pathol* **86**, 117-122.
2. Anandalakshmi, R., Pruss, G. J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A. C., Smith, T. H. & Vance, V. B. (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 13079–13084.
3. Baulcombe, D. C. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* **431**, 356-363.
4. Bayne, E. H., Rakitina, D. V., Morozov, S. Y. & Baulcombe, D. C. (2005). Cell-to-cell movement of potato potexvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. *Plant J* **44**, 471-82.
5. Bol, J. F. (1999). Alfalfa mosaic virus and ilarviruses: involvement of coat protein in multiple steps of the replication cycle. *J Gen Virol* **80**, 1089–1102.
6. Bol, J. F. (2003). *Alfalfa mosaic virus*: coat protein-dependent initiation of infection. *Mol Plant Pathol* **4**, 1–8.
7. Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W. X., Ji, L. H., Ding, S. W. & Baulcombe, D. C. (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J* **17**, 6739-6746.
8. Brosnan, C. A., Mitter, N., Christie, M., Smith, N. A., Waterhouse, P. M. & Carroll, B. J. (2007). Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 14741-14746.

9. Callaway, A., Giesman-Cookmeyer, D., Gillock, E. T., Sit, T. L. & Lommel, S. A. (2001). THE MULTIFUNCTIONAL CAPSID PROTEINS OF PLANT RNA VIRUSES. *Annu Rev Phytopathol* **39**, 419-460.
10. Canizares, MC., Taylor, K. M. & Lomonossoff, G. P. (2004). Surface-exposed C-terminal amino acids of the small coat protein of Cowpea mosaic virus are required for suppression of silencing. *J Gen Virol* **85**, 3431-3435.
11. Cao, X., Zhou, P., Zhang, X., Zhu, S., Zhong, X., Xiao, Q., Ding, B. & Li, Y. (2005). Identification of an RNA silencing suppressor from a plant double-stranded RNA virus. *J Virol* **79**, 13018-13027.
12. Carrington, J. C., Freed, D. D. & Sanders, T. C. (1989). Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in *Escherichia coli* and in vitro. *J Virol* **63**, 4459-4463.
13. Chapman, E. J., Prokhnevsky, A. I., Gopinath, K., Dolja, V. V. & Carrington, J. C. (2004). Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev* **18**, 1179-1186.
14. Chiba, M., Reed, J. C., Prokhnevsky, A. I., Chapman, E. J., Mawassi, M., Koonin, E. V., Carrington, J. C. & Dolja, V. V. (2006). Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon. *Virology* **346**, 7-14.
15. Choi, C. W., Qu, F., Ren, T., Ye, X. & Morris, T. J. (2004). RNA silencing-suppressor function of Turnip crinkle virus coat protein cannot be attributed to its interaction with the Arabidopsis protein TIP. *J Gen Virol* **85**, 3415-3420.
16. Cogoni, C. (2001). Homology-dependent gene silencing mechanisms in fungi. *Annu Rev Microbiol* **55**, 381-406.

17. Cronin, S., Verchot, J., Haldeman-Cahill, R., Schaad, M. C. & Carrington, J. C. (1995). Long distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell* 7, 549–559.
18. Desvignes, J. C. & Boye, R. (1989). Different disease caused by the chlorotic leaf spot virus on the fruit trees. *Acta Hort* 235, 31-38.
19. Diaz-Pendon, J. A., Li, F., Li, W. X. & Ding, S. W. (2007). Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in Arabidopsis is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *Plant Cell* 19, 2053-2063.
20. Ding, S. W., Li, H. W., Lu, R., Li, F. & Li, W. X. (2004). RNA silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals. *Virus Res* 102, 109-115.
21. Dunoyer, P., Lecellier, C. H., Parizotto, E. A., Himber, C. & Voinnet, O. (2004). Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* 16, 1235-1250.
22. English, J. J., Davenport, G. F., Elmayan, T., Vaucheret, H. & Baulcombe, D. C. (1997). Requirement of sense transcription for homology-dependent virus resistance and trans-inactivation, *Plant J.* 12, 597–603.
23. German, S., Candresse, T., Lanneau, M., Huet, J. C., Pernollet, J.C. & Dunez, J. (1990). Nucleotide sequence and genomic organization of apple chlorotic leaf spot closterovirus. *Virology* 179, 104-112.
24. German-Retana, S., Bergey, B., Delbos, R. P., Candresse, T. & Dunez, J. (1997). Complete nucleotide sequence of the genome of a severe cherry isolate of apple chlorotic leaf spot trichovirus (ACLSV). *Arch Virol* 142, 833-841.

25. Gopinath, K., Dragnea, B. & Kao, C. (2005). Interaction between *Brome mosaic virus* proteins and RNAs: effects on RNA replication, protein expression, and RNA stability. *J Virol* **79**, 14222-14234.
26. Goto, K., Kobori, T., Kosaka, Y., Natsuaki, T. & Masuta, C. (2007). Characterization of silencing suppressor 2b of cucumber mosaic virus based on examination of its small RNA-binding abilities. *Plant Cell Physiol* **48**, 1050-1060.
27. Guo, H. S. & Ding, S. W. (2002). A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO J* **21**, 398-407.
28. Guogas, L. M., Laforest, S. M. & Gehrke, L. (2005). Coat protein activation of alfalfa mosaic virus replication is concentration dependent. *J Virol* **79**, 5752-5761.
29. Hamilton, A. J. & Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**, 950-952.
30. Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. & Baulcombe, D. (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J* **21**, 4671-4679.
31. Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. & Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293-296.
32. Hannon, G. J. (2002). RNA interference. *Nature* **418**, 244-251.
33. Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C. & Voinnet, O. (2003). Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J* **22**, 4523-4533.
34. 家城洋之(2002). 果樹のウイルス・ウイロイド病. 農村漁村文化協会,東京. pp. 62-71.

35. 五十嵐亜紀(2007). リンゴ小球形潜在ウイルスベクターを利用した植物内在性遺伝子の RNA サイレンシングの誘導. 岩手大学大学院農学研究科修士論文.
36. Isogai, M., Uyeda, I. & Lindsten, K. (1998). Taxonomic characteristics of fijiviruses based on nucleotide sequences of the oat sterile dwarf virus genome. *J Gen Virol* 79, 1479-1485.
37. Isogai, M., Saitou, Y., Takahashi, N., Itabashi, T., Terada, M., Satoh, H. & Yoshikawa, N. (2003). The 50-kDa protein of Apple chlorotic leaf spot virus interferes with intracellular and intercellular targeting and tubule-inducing activity of the 39-kDa protein of Grapevine berry inner necrosis virus. *Mol Plant Microbe Interact* 16, 188-195.
38. Isogai, M. & Yoshikawa, N. (2005). Mapping the RNA-binding domain on the Apple chlorotic leaf spot virus movement protein. *J Gen Virol* 86, 225-229.
39. Jelkmann, W. (1996). The nucleotide sequence of a strain of apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) responsible for plum pseudopox and its relation to an apple and plum bark split strain. *Phytopathology* 86, 101-101.
40. Kasschau, K. D. & Carrington, J. C. (1998). A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95, 461-470.
41. Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E. J., Krizan, K. A. & Carrington, J. C. (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev Cell* 4, 205-217.
42. Kobori, T., Osaki, T. & Ohki, S. T. (2003). *Cucumber mosaic virus* establishes systemic infection at increased temperature following viral entrance into the phloem pathway of *Tetragonia expansa*. *Phytopathology* 93, 1445-1451.

43. Krab, I. M., Caldwell, C., Gallie, D. R. & Bol, J. F. (2005). Coat protein enhances translational efficiency of Alfalfa mosaic virus RNAs and interacts with the eIF4G component of initiation factor eIF4F. *J Gen Virol* **86**, 1841-1849.
44. Kubota, K., Tsuda, S., Tamai, A. & Meshi, T. (2003). Tomato mosaic virus replication protein suppresses virus-targeted posttranscriptional gene silencing. *J Virol* **77**, 11016-11026.
45. Kurihara, Y., Inaba, N., Kutsuna, N., Takeda, A., Tagami, Y. & Watanabe, Y. (2007). Binding of tobamovirus replication protein with small RNA duplexes. *J Gen Virol* **88**, 2347-2352.
46. Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D. & Burgyan, J. (2004). Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO J* **23**, 876-884.
47. Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E. J., Carrington, J. C., Liu, Y. P., Dolja, V. V., Calvino, L. F., Lopez-Moya, J. J. & Burgyan, J. (2006). Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J* **25**, 2768-2780.
48. Li, C., Yoshikawa, N., Takahashi, T., Ito, T., Yoshida, K. & Koganezawa, H. (2000). Nucleotide sequence and genome organization of Apple latent spherical virus: a new virus classified into the family *Comoviridae*. *J Gen Virol* **81**, 541-547.
49. Li, C., Sasaki, N., Isogai, M. & Yoshikawa, N. (2004). Stable expression of foreign proteins in herbaceous and apple plants using Apple latent spherical virus RNA2 vectors. *Arch Virol* **149**, 1541-1558.

50. Liang, X.-Z., Lee, B. T. K. & Wong, S.-M. (2002). Covariation in the capsid protein of hibiscus chlorotic ringspot virus induced by serial passaging in a host that restricts movement leads to avirulence in its systemic host. *J Virol* 76, 12320–12324.
51. Lister, R. M. (1970). Apple chlorotic leaf spot virus. *CMI AAB Description of Plant Viruses*, No. 30.
52. Lu, R., Folimonov, A., Shintaku, M., Li, W. X., Falk, B. W., Dawson, W. O. & Ding, S.-W. (2004). Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15742-15747.
53. Magome, H., Yoshikawa, N., Takahashi, T., Ito, T. & Miyakawa, T. (1997). Molecular Variability of the Genomes of Capilloviruses from Apple, Japanese Pear, European Pear, and Citrus Trees. *Phytopathology* 87, 389-396.
54. Magome, H., Yoshikawa, N. & Takahashi, T. (1999). Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of Apple Stem Grooving Capillovirus Sequence Variants. *Phytopathology* 89, 136-140.
55. Maia, I. G., Haenni, A.-L. & Bernardi, F. (1996). Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. *J Gen Virol* 77, 1335–1341.
56. Mallory, A.C., Ely, L., Smith, T.H., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L., and Vance, V.B. (2001). HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell* 13, 571–583.
57. Mallory, A. C., Mlotshwa, S., Bowman, L. H. & Vance, V. B. (2003). The capacity of transgenic tobacco to send a systemic RNA silencing signal depends on the nature of the inducing transgene locus. *Plant J* 35, 82–92.

58. Martelli, G. P., Candresse, T. & Namba, S. (1994). Trichovirus, a new genus of plant viruses. *Arch Virol* **134**, 451-455.
59. Merai, Z., Kerenyi, Z., Kertesz, S., Magna, M., Lakatos, L. & Silhavy, D. (2006). Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol* **80**, 5747-5756.
60. Mitsuhashi, I., Ugaki, M., Hirochika, H., Ohshima, M., Murakami, T., Gotoh, Y., Katayose, Y., Nakamura, S., Honkura, R., Nishimiya, S., Ueno, K., Mochizuki, A., Tanimoto, H., Tsugawa, H., Otsuki, Y. & Ohashi, Y. (1996). Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant and Cell Physiology* **37**, 49-59.
61. Mlotshwa, S., Voinnet, O., Mette, M. F., Matzke, M., Vaucheret, H., Ding, S. W., Pruss, G. & Vance, V. B. (2002). RNA silencing and the mobile silencing signal. *Plant Cell* **14** (Suppl.), S289-S301.
62. Mushegian, A. R. & Koonin, E. V. (1993). Cell-to-cell movement of plant viruses. Insights from amino acid sequence comparisons of movement proteins and from analogies with cellular transport systems. *Arch Virol* **133**, 239-257.
63. Neeleman, L., Linthorst, H. J. M. & Bol, J. F. (2004). Efficient translation of alfamovirus RNAs requires the binding of coat protein dimers to the 3' termini of the viral RNAs. *J Gen Virol* **85**, 231-240.
64. 小田豊・吉川信幸・高橋壯(1998). わが国のリンゴから分離されたリンゴステムピットティングウイルス(ASPV)のゲノム構造. 日本植物病理学会報 **64**, 418.

65. Palauqui, J. C., Elmayan, T., Pollien, J. M. & Vaucheret, H. (1997). Systemic acquired silencing: transgene-specific posttranscriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J* **16**, 4738-4745.
66. Peng, Y. H., Kadoury, D., Gal-on, A., Huet, H., Wang, Y. & Raccach, B. (1998). Mutations in the HC-Pro gene of zucchini yellow mosaic potyvirus: Effects on aphid transmission and binding to purified virions. *J Gen Virol* **79**, 897-904.
67. Qu, F., Ren, T. & Morris, T. J. (2003). The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *J Virol* **77**, 511-522.
68. Rahim, M. D., Andika, I. B., Han, C., Kondo, H. & Tamada, T. (2007). RNA4-encoded p31 of beet necrotic yellow vein virus is involved in efficient vector transmission, symptom severity and silencing suppression in roots. *J Gen Virol* **88**, 1611-1619.
69. Rico, P., Ivars, P., Elena, S. F. & Hernandez, C. (2006). Insights into the selective pressures restricting Pelargonium flower break virus genome variability: Evidence for host adaptation. *J Virol* **80**, 8124-8132.
70. Riechmann, J. L., Lain, S. & Garcia, J. A. (1992). Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J Gen Virol* **73**, 1-16.
71. Rojas, M. R., Zerbini, F. M., Allison, R. F., Gilbertson, R. L. & Lucas, W. J. (1997). Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* **237**, 283-295.
72. Roth, B. M., Pruss, G. J. & Vance, V. B. (2004). Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Res* **102**, 97-108.

73. Ryang, B. S., Kobori, T., Matsumoto, T., Kosaka, Y. & Ohki, S.,T. (2004). *Cucumber mosaic virus* 2b protein compensates for restricted systemic spread of *Potato virus Y* in doubly infected tobacco. *J Gen Virol* **85**, 3405-3414.
74. Saiga, T., Fujiwara, M., Saitoh, H., Ohki, S. T. & Osaki, T. (1998). Comparative analysis for replication and movement of *cucumber mosaic virus* in *Cucumis figarei* and *C. melo*. *Ann Phytopathol Soc Jpn* **64**, 255-263.
75. 佐々木貴子(1996). リンゴのウイルスに関する研究-リンゴクロロティックリーフスポットウイルス(ミツバ潜在系)ゲノムの 3'末端領域の塩基配列. 岩手大学農学部卒業論文.
76. 佐々木貴子(1998). リンゴクロロティックリーフスポットウイルス(ミツバ潜在系)の病原学的研究. 岩手大学大学院農学研究科修士論文.
77. Sato, K., Yoshikawa, N. & Takahashi, T. (1993). Complete nucleotide sequence of the genome of an apple isolate of apple chlorotic leaf spot virus. *J Gen Virol* **74**, 1927-1931.
78. 佐藤寛(1997). 植物ウイルスの細胞間移行タンパク質に関する研究-細胞間移行タンパク質遺伝子解析のための感染性 cDNA クローンの作出. 岩手大学大学院農学研究科修士論文.
79. Satoh, H., Yoshikawa, N. & Takahashi, T. (1999). Construction and biolistic inoculation of an infectious cDNA clone of apple chlorotic leaf spot trichovirus. *Ann Phytopathol Soc Jpn* **65**, 301-304.
80. Satoh, H., Matsuda, H., Kawamura, T., Isogai, M., Yoshikawa, N. & Takahashi, T. (2000). Intracellular distribution, cell-to-cell trafficking and tubule-inducing activity of the 50 kDa movement protein of *Apple chlorotic leaf spot virus* fused to green fluorescent protein. *J Gen Virol* **81**, 2085-2093.

81. 佐藤寛(2003). リンゴクロロティックリーフスポットウイルスの細胞間移行タンパク質に関する研究. 岩手大学大学院連合農学研究科博士論文.
82. 田村顕裕(2007). CFP と YFP を発現するタバコ植物の作出とウイルス移行解析への利用. 岩手大学農学部卒業論文.
83. 田山堅(2000). 輪状さび果病罹病リンゴ樹からのリンゴクロロティックリーフスポットウイルスの分離と解析. 岩手大学農学部卒業論文.
84. Thomas, C. L., Leh, V., Lederer, C. & Maule, A. J. (2003). Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology* 306, 33–41.
85. Urcuqui-Inchima, S., Walter, J., Drugeon, G., German-Retana, S., Haenni, A. L., Candresse, T., Bernardi, F. & Le Gall, O. (1999). Potyvirus helper component-proteinase self-interaction in the yeast two-hybrid system and delineation of the interaction domain involved. *Virology* 258, 95–99.
86. Vance, V. & Vaucheret, H. (2001). RNA silencing in plants-defense and counterdefense. *Science* 292, 2277-2280.
87. Vargason, J. M., Szittya, G., Burgyan, J. & Tanaka, Hall, T. M. (2003). Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* 115, 799-811.
88. Verchot-Lubicz, J., Ye, C. M. & Bamunusinghe, D.(2007). Molecular biology of potexviruses: recent advances. *J Gen Virol* 88, 1643-1655.
89. Voinnet, O. (2005a). Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet* 6, 206-220.
90. Voinnet, O. (2005b). Non-cell autonomous RNA silencing. *FEBS Lett* 26, 5858-5871.

91. Voinnet, O. & Baulcombe, D. C. (1997). Systemic signalling in gene silencing. *Nature* **389**, 553.
92. Voinnet, O., Vain, P., Angell, S. & Baulcombe, D. C. (1998). Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* **95**, 177-87.
93. Voinnet, O., Pinto, Y. M. & Baulcombe, D. C. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 14147-52.
94. Voinnet, O., Lederer, C. & Baulcombe, D. C. (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* **103**, 157-167.
95. Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. & Baulcombe, D. C. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* **33**, 949-956.
96. Wang, M. B. & Metzlaff, M. (2005). RNA silencing and antiviral defense in plants. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 216-222.
97. 八重樫元(2005). リンゴクロロティックリーフスポットウイルス分離株間で認められる外被タンパク質アミノ酸変異の解析. 岩手大学大学院農学研究科修士論文.
98. 山形広輔(2007). シロイヌナズナ FT 遺伝子を導入したリンゴ小球形潜在ウイルスベクターによる各種果樹の花芽形成促進. 岩手大学大学院農学研究科修士論文.
99. 山口昭・大竹昭朗(1986). 果樹の病害虫-診断と防除. 農村漁村文化協会, 東京. pp. 210-219.

100. 山蔦翼(2006). リンゴ小球形潜在ウイルスの感染による RNA サイレンシングの誘導. 岩手大学大学院農学研究科修士論文.
101. Yanase, H. (1974). Studies on apple latent viruses in Japan. *Bull Fruit Tree Res Sn, Jpn Ser C1*, 47-109.
102. Yoshikawa, N. (2001). Apple chlorotic leaf spot virus. *CMI AAB Description of Plant Viruses*, no.386 (No. 30 revised).
103. Yoshikawa, N. & Takahashi, T. (1988). Properties of RNAs and proteins of apple stem grooving and apple chlorotic leaf spot viruses. *J Gen Virol* **69**, 241-245.
104. Yoshikawa, N., Oogake, S., Terada, M., Miyabayashi, S., Ikeda, Y., Takahashi, T. & Ogawa, K. (1999). Apple chlorotic leaf spot virus 50 kDa protein is targeted to plasmodesmata and accumulates in sieve elements in transgenic plant leaves. *Arch Virol* **144**, 2475-2483.
105. Yoshikawa, N., Gotoh, S., Umezawa, M., Satoh, N., Satoh, H., Takahashi, T., Ito, T. & Yoshida, K. (2000). Transgenic *Nicotiana occidentalis* plants expressing the 50-kDa protein of *Apple chlorotic leaf spot virus* display increased susceptibility to homologous virus, but strong resistance to *Grapevine berry inner necrosis virus*. *Phytopathology* **90**, 311-316.
106. Yoshikawa, N., Matsuda, H., Oda, Y., Isogai, M., Takahashi, T., Ito, T. & Yoshida, Y. (2001). Genome heterogeneity of Apple stem pitting virus in apple trees. *Acta Horticulturae* **550**, 285-290.
107. Zamore, P. D. (2002). Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science* **296**, 1265-1269.

- 108. Zhang, X., Yuan, Y. R., Pei, Y., Lin, S. S., Tuschl, T., Patel, D. J. & Chua, N. H. (2006).** Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev* **20**, 3255-3268.