

カブモザイクウイルス (TuMV) ゲノム由来の遺伝子を導入した *Nicotiana benthamiana* における TuMV 抵抗性

野村研・植草秀敏・北宜裕¹⁾

Turnip mosaic virus (TuMV) resistance of transgenic *Nicotiana benthamiana* plants containing transgenes derived from TuMV genome

Ken NOMURA, Hidetoshi UEKUSA and Nobuhiro KITA¹⁾

摘 要

カブモザイクウイルス (TuMV) のコートタンパク質 (CP) 遺伝子, NIB 遺伝子及び VPg 遺伝子を植物に導入し, 抵抗性レベルや抵抗性個体の獲得効率などを比較する目的で, TuMV-JO の CP 全長遺伝子 864 bp (CP) 及び 3'末端側 430 bp (CP3'), NIB 遺伝子の 3'末端側 820 bp (NIB3'), VPg 全長遺伝子 575 bp (VPg) をそれぞれ *Nicotiana benthamiana* に導入し, 得られた形質転換 T₁ 及び T₂ 系統の TuMV 抵抗性について調べた. その結果, T₁ 世代の系統では, いずれの遺伝子を導入した場合でも TuMV 接種後にまったく病徴が認められない高度抵抗性を示す個体や, TuMV を接種後の直上葉には病徴が認められるが, その後展開してくる葉には病徴が認められない回復型抵抗性を示す個体が確認された. 導入遺伝子の違いによる抵抗性レベルに差は認められなかった. T₁ 世代で高度抵抗性を示す個体が半数以上を占めた系統は, CP 及び NIB3' では 7 系統, VPg では 3 系統, CP3' では 2 系統であり, これらの自殖 T₂ 世代はすべて高度抵抗性を示した. ノーザンブロット解析では, 抵抗性を示す系統はいずれも導入遺伝子の検出レベルが低く, CP 遺伝子を導入した形質転換体の TuMV 抵抗性植物からは導入遺伝子由来の siRNA が検出されたことから, 形質転換体の TuMV 抵抗性は導入遺伝子の RNA サイレncing によることが示唆された.

キーワード: TuMV, ウイルス抵抗性, 形質転換, RNA サイレncing

Summary

Transgenic *Nicotiana benthamiana* plants containing transgenes derived from full-length coat protein (CP) gene (864bp), 3' region of the CP gene (430bp), 3' region of NIB gene (820bp) and full-length VPg gene (575bp) of *Turnip mosaic virus* (TuMV) genome were analyzed for their resistance to TuMV. Complete and recovery types of resistant plants were obtained from all the transgenic T₁ plants regardless of the introduced transgenes. The level of the TuMV resistance did not differ among the TuMV resistant lines of the T₁ generation. Number of TuMV resistant T₁ generations that showed complete TuMV resistance in T₁ generation were 7, 3 and 2 lines with CP or NIB3', VPg and CP3' transgenes, respectively, all of which T₂ generations were completely resistant to TuMV. Northern blot analysis of these TuMV resistant T₂ generations revealed that the steady-state levels of transgene expression was quite low whereas distinct small interfering RNAs derived from the posttranscriptionally-digested transgene transcripts were detected, suggesting that the resistance is attributed to the RNA silencing of the transgenes.

Key words: TuMV, virus resistance, transgenic, RNA silencing

¹⁾現神奈川県環境農政局農政部農業振興課

緒言

植物ウイルスの遺伝子は一般に、粒子を構成する外被タンパク質 (CP) 遺伝子や遺伝子の複製に関与する複製酵素 (Rp) 遺伝子の他、ウイルスの細胞間または長距離移行に関与する移行タンパク質 (MP) などをコードしている。これらの遺伝子を植物に導入することでウイルス抵抗性を付与できることが知られており、抵抗性植物を得るための遺伝子としては CP の他、Rp や MP をコードする遺伝子、及びこれらのアンチセンス遺伝子などがある。また、このような形質転換植物における抵抗性の機構は、導入遺伝子から翻訳されたタンパク質が関与する protein-mediated resistance (PMR) と、転写された RNA が関与する RNA mediated resistance (RMR) に大別されてきた (Lomonossoff 1995)。タバコモザイクウイルス (TMV) の場合、Rp である 54K タンパク質遺伝子を導入したタバコの抵抗性には翻訳産物が必要であり、54K の約 20% しか翻訳されない遺伝子を導入したタバコでは抵抗性を示さないことから、そのメカニズムは PMR と考えられた (Carr et al 1992)。また、アルファルファモザイクウイルス (AIMV) の Rp 導入植物でも抵抗性には翻訳産物が必要とされている (Palukaitis et al 1997)。TMV の MP である 30K タンパク質あるいはシロクロバモザイクウイルス (WCIMV) の MP の一つである 13K タンパク質に変異を施した cDNA をタバコに導入したところ、複数種のウイルスに対する抵抗性が付与されている (Cooper et al 1995, Beck et al 1994)。一方、CMV の Rp 遺伝子導入植物の抵抗性や、ササゲモザイクウイルス (CPMV) の MP 遺伝子導入植物における抵抗性は、RMR によることが報告されている (Sijen et al 1996)。

Potyvirus の遺伝子を導入した形質転換植物には、ジャガイモ Y ウイルス (PVY) やエンドウ種子伝染モザイクウイルス (PSbMV) の Nib 遺伝子を導入したタバコやエンドウ (Audy et al 1994, Jones et al 1998)、タバコエッチウイルス (TEV) の VPg 遺伝子を導入したタバコ (Swaney et al 1995) 等があり、これらの形質転換植物におけるウイルス抵抗性機構は RMR であるとされている。このように多くのウイルスと植物の組み合わせでウイルスのゲノム遺伝子を導入した形質転換植物におけるウイルス抵抗性について研究が進められ、

パパイヤなど一部の作物ではすでに実用利用されている (Prins et al 2008, Fuchs and Gonsalves 2008)。

Potyvirus に属するカブモザイクウイルス (TuMV) は、カブ、ダイコンや菜種などのアブラナ科作物に感染し、葉にモザイク症状や株全体を萎縮させるなどの病徴を引き起こす (Tomlinson 1987)。われわれはこれまでに TuMV の CP 遺伝子を導入したシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) における TuMV 抵抗性について解析してきた (Nomura et al 2004)。しかし、TuMV がコードする各種ゲノム遺伝子を植物に導入し、導入遺伝子の種類による抵抗性レベルや抵抗性個体を獲得するための効率を相対的に比較した研究事例はない。

植物からの有用遺伝子の単離や、遺伝子の機能を調べて実用作物に応用するためにシロイヌナズナやタバコなどのモデル植物が利用されている。中でもタバコの近縁種である *Nicotiana benthamiana* は TMV や CMV, PVY など多くのウイルスに感受性が高く、TuMV に感染した際も極めて激しい病徴を示す。また、植物体の中程度の大きさであるためサンプリングしやすいだけでなく接ぎ木も可能で、リーフディスク法による形質転換法も確立されていることから、ウイルス抵抗性の研究に広く用いられている。そこで本研究では、TuMV の全長 CP 遺伝子の他、CP 遺伝子の 3'末端側部分塩基配列、Nib 遺伝子の 3'末端側塩基配列及び全長 VPg 遺伝子を導入できるコンストラクトを構築し、*N.benthamiana* に導入して抵抗性レベルや抵抗性個体の獲得効率等について比較した。

材料及び方法

1. TuMV 遺伝子のクローニング

TuMV の CP 遺伝子、Nib 遺伝子及び VPg 遺伝子の各種領域を植物に導入し、抵抗性レベル等を比較検討する目的で、TuMV-JO の CP 全長遺伝子 864 bp (Nomura et al 2004) の他、CP の 3'末端側 430 bp (以下 CP3'), Nib 遺伝子の 3'末端側 820 bp (以下 Nib3'), VPg 遺伝子全長 575 bp (以下 VPg) を RT-PCR によりクローニングした。PCR に用いたプライマーは、CP3' については CPF-2 (GGATCCTGGAATCCCCGATCAACCG) 及び CPR-1 (GAGCTCTCATAACCCCTTAACGCC) を、Nib3' については NibF1 (GGATCCTATTGCGAT

GCTGATGGCTC) 及び NibR1 (GAGCTCTTACTGGT GATAAACACAAGCTT) を、また、VPg については VPgF1 (GGATCCATGGCGAAAGGCAAGAGGCAAA G) 及び VPgR1 (GAGCTCTTACTCGTGGTCCACTG GGGACGA) を用いた。なお、バイナリーベクター pBI121 にクローニングするため、いずれのプライマーにも制限酵素部位としてフォワードプライマーには BamHI 部位を、また、リバースプライマーには SacI 部位を付加した(配列下線部)。RT-PCR には精製した TuMV-JO の RNA を鋳型に RNA LA PCR キット (TaKaRa) を用いて行った。RT-PCR の反応条件は既報 (Nomura et al 2004) に準じて行った。

PCR 増幅断片はいずれも、pT7Blue ベクター (Novagen) にクローニング後、ABI3130DNA シーケンサーにより塩基配列を決定し、目的とする遺伝子が単離できていることを確認した。クローニングした各遺伝子断片を含むプラスミドを制限酵素 BamHI 及び SacI で処理して各遺伝子断片をゲル精製した。各遺伝子をバイナリーベクター pBI121 の GUS 遺伝子と置換し、遺伝子導入用のコンストラクトとして pBI-CP3', pBI-Nib3' 及び pBI-VPg を構築した(図1)。これらのコンストラクトはそれぞれトリペアレンタルメイティング法 (Ditta et al 1980) によりアグロバクテリウム (LBA4404) に移行させた。

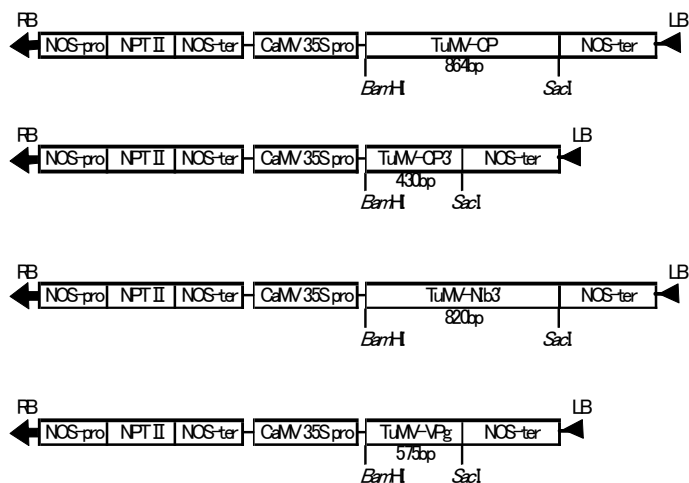


図1 バイナリーベクター pBI121 を基に構築したコンストラクトの構造
 NOS-Pro: ノンセンスターゼプロモーター, NPTII: カナマイシン抵抗性遺伝子, NOS-Ter: ノンセンスターゼターミネーター, CaMV 35Spro: カリフラワーモザイクウイルス 35Sプロモーター, TuMV: カブモザイクウイルス, CP: 外被タンパク質遺伝子, Nib: 複製素遺伝子, VPg: ゲノム結合タンパク質遺伝子

2. *Nicotiana benthamiana* の形質転換

N.benthamiana の形質転換はリーフディスク法 (Horsch et al 1985) により行った。*N.benthamiana* の葉を 70 %エタノールで1分及び次亜塩素酸ナトリウムで5分間攪拌後、滅菌水で洗浄した。シャーレ内のアグロバクテリウム菌液中で1cm程度にメスで切断し、MS-NB 培地 (1 µg/ml 6-ベンジルアミノプリン, 0.1 µg/ml ナフタレン酢酸含む) に置床して共存培養した。3日後にクラフォランを含む MS-NB 培地に移植し、アグロバクテリウムを除菌するとともにカルス形成を促進した。10日後にカナマイシン (25 µg/ml) 及びクラフォラン (150 µg/ml) を含む MS-NB 培地に移植し、カナマイシン耐性を選抜マーカーにして形質転換体の選抜を進めた。カルスから形成された不定芽をさらにカナマイシン及びクラフォランを含む MS 培地に移植して選抜を進めた。再分化して発根し、植物体が正常に生育したものを T₀ 世代として順次鉢上げし、25 °C, 12 時間日長のグロースチャンバーで育成した。各形質転換体から次世代を採種し、カナマイシン (25 µg/l) を含む MS 培地に無菌播種し、カナマイシン耐性をマーカーにして形質転換体 T₁ 世代を選抜した。

3. 汁液接種試験

TuMV-JO に感染したコカブまたは *N.benthamiana* のモザイク葉を接種源とし、T₁ 及びその自殖後代である T₂ 世代の系統各 8~20 個体に定法により汁液接種した。また、抵抗性個体が得られた系統の一部については、自家受精により次世代を採種・育成し、T₃ 及び T₄ 世代への接種を行なって TuMV に対する反応を調べた。

4. 導入遺伝子の確認

形質転換植物における導入遺伝子の確認は、T₀ 世代についてはカナマイシン耐性個体を選抜・育成後、CP 遺伝子については TuMV-CP 遺伝子の内部に設計した検出プライマーによる PCR により行った。検出プライマーには CP 遺伝子内部に設計した CPU1 (5'-TTAACAGACGAGCAAAAAGCA-3') 及び CPL1 (5'-TCCATCCAAGCCGAACAAAT-3') を用い、形質転換体から抽出した全 DNA を鋳型に PCR を行った。また、CP3', Nib3' 及び VPg 遺伝子の検出については導入遺伝子の増幅に用いたプライマーによる PCR により行った。T₁ 世代については自殖種子をカナマイシンを含む MS 培地に無菌は種し、薬剤耐性による選抜

後、PCR により導入遺伝子を検出して目的とする形質転換体であることを確認した。さらに、抵抗性及び感受性を示す典型的な系統を複数選び、サザンブロット解析を行った。

5. サザンブロット解析

0.5 g の葉から全 DNA を CTAB 法により抽出した。まず、0.1~1 g の葉を -80 °C のフリーザー内で乳鉢とともに凍結後、磨砕してパウダー状にした。乳鉢にサンプルの 3 倍量の CTAB 抽出液を加えて混合し、溶解後、マイクロチューブまたは 15 ml 遠心チューブに回収した。1/2 容量の TE 飽和フェノール及びクロロフォルムを加えて転倒混和し、15,000 × g で 10 分間遠心した。上層を回収し、等量のクロロフォルム・イソアミルアルコールを加えて転倒混和し、15,000 × g で 10 分間遠心した。上層を回収し、等量のイソプロパノールまたは 2.5 倍量の 99 % エタノールを加えて混合し、15,000 × g で 15 分間遠心して DNA を沈殿させた。70 % エタノール洗浄を行い、10 分間風乾後、RNase を含む TE に溶解して DNA サンプルとした。分光光度計 (Beckman) により DNA の濃度を測定し、10 µg のゲノム DNA を制限酵素 *Bam*HI で消化した。制限酵素処理後の DNA をフェノール・クロロフォルム抽出により精製し、エタノール沈殿後、10 µl の TE に再度溶解し、1 % アガロースゲル電気泳動後、バキュームブロットティング装置

(Bio-Rad) を用いてナイロンメンブレン (Roshe) に DNA を転写した。プローブの合成は DIG PCR プローブ合成キット (Roshe) を用い、各遺伝子をクローニングしたプラスミドを鋳型にして導入遺伝子に相当するプローブを合成した。プロトコールに従い、0.1 % SDS を含む 2 × SSC 及び 0.2 × SSC による洗浄、ブロッキング及び AP 標識 DIG 抗体処理を行い、メンブレンの洗浄後、化学発光検出フィルム (Roche) に 5~15 分間露光してシグナルを検出した。

6. ノーザンブロット解析

全 RNA は Easyprep RNA 抽出キット (TaKaRa) を用い、0.5 g の葉から抽出した。いずれのサンプルも 5 µl の全 RNA を MOPS 変性ゲルにより泳動し、バキュームブロットティングによりナイロンメンブレンに転写した。プローブにはサザンブロットと同様に DIG 標識

した PCR プローブを用い、ハイブリダイゼーション及びシグナルの検出を行った。

7. TuMV 抵抗性形質転換体からの siRNA の検出

全 RNA はノーザンブロット解析と同様に 0.5 g の葉から抽出した。siRNA の分画には塩化リチウムを用いて分画した。エタノール沈殿後の低分子 RNA サンプルを 50 µl の DEPC 処理水に溶解し、この内 10 µl を電気泳動に供試した。pT7Blue ベクターに挿入した CP 遺伝子を用い、DIG ラベルしたセンス鎖の RNA プローブをそれぞれ合成し、ハイブリダイゼーションに用いた。電気泳動及びナイロンメンブレンへの転写、シグナルの検出はいずれもノーザンブロットと同様の手法で行った。

結果

1. TuMV-CP 遺伝子を導入した *Nicotiana benthamiana* の TuMV に対する反応

N.benthamiana にリーフディスク法で TuMV-CP 及び CP3' を導入し、各遺伝子について 20 個体のカナマイシン耐性を示す再分化個体を得た。これらの幼植物から DNA を抽出し、PCR 法により導入遺伝子の存在を調べた結果、全ての個体から目的とする遺伝子が検出された。これらの形質転換体 T₀ 世代から T₁ 世代を採種し、カナマイシンによる選抜をして育成後、TuMV 抵抗性検定に供試した。その結果、TuMV-CP を導入した形質転換体 (*Nb*-Tu-CP) では T₁ 世代の多くは非形質転換体と同様に TuMV 感受性であったが、抵抗性個体が多くを占める形質転換系統が認められ、CP1, CP2,



図2 *N.benthamiana* 非形質転換体(A)及び TuMV-CP 遺伝子を導入した形質転換体(B~D)の TuMV に対する反応。
A, B: 感受性、C: 回復型抵抗性、D: 抵抗性

表1 TuMV-CP遺伝子を導入した*N.benthamiana*形質転換体 T₁及びT₂世代のTuMVに対する反応

親系統	TuMVに対する反応		抵抗性個体 (%)
	抵抗性 (うち回復型)	感受性	
T ₀ 植物			
CP1	16	4	80
CP2	10	10	50
CP3	0	20	0
CP4	10 (10)	10	50
CP5	7 (7)	13	35
CP6	2	20	10
CP7	4 (4)	16	25
CP8	0	20	0
CP9	12 (4)	8	60
CP10	0	20	0
CP11	0	20	0
CP12	18 (1)	2	90
CP13	14 (4)	6	70
CP14	0	20	0
CP15	0	20	0
CP16	0	20	0
CP17	0	20	0
CP18	3 (3)	17	15
CP19	16 (2)	4	80
CP20	18	2	90
T ₁ 植物			
CP1-R1	6	6	50
1-R2	10	4	71
1-R3	7	1	88
CP2-R1	3	3	50
2-R2	7	0	100
2-R3	8	0	100
CP10-S1	0	10	0
10-S2	0	10	0
CP12-R1	7	0	100
12-R2	8	0	100
12-R3	5	5	50

CP9, CP12, CP13, CP19 及び CP20 の7系統については供試個体の50%以上がTuMV接種後も全く病徴が認められないことからTuMV抵抗性系統と判断した(表1, 図2D)。また, 接種した系統中の一部植物に, TuMVを接種した後に展開してくる葉には病徴が見られるが, その後に展開する葉には病徴が認められなくなる回復型抵抗性を示す個体が確認された(図2C)。

抵抗性系統 CP1, CP2 及び CP12 からそれぞれ3個体を選び, 後代を採種し, カナマイシンによる選抜・育成後, TuMV抵抗性検定を行った。その結果, 供試個体の全てが抵抗性を示す系統 (CP2-R2, CP2-R3, CP12-R1, CP12-R2) 及び抵抗性と感受性が分離する系統 (CP1-R1, CP1-R2, CP1-R3, CP2-R1, CP12-R3) が得られた。また, 全個体が抵抗性となる系統の後代について抵抗性検定を行ったところ, 全ての個体が抵抗性であった(データ省略)。

TuMV-CP3'を導入した形質転換体 (*Nb*-Tu-CP3') のTuMVに対する反応は *Nb*-Tu-CP とほぼ同様であり, その反応は完全な抵抗性を示す個体, 回復型抵抗性を示す個体及び感受性個体に分類されたが, 抵抗性個体が得られたのは CP3'1, CP3'3, CP3'4, CP3'5, CP3'6, CP3'9, CP3'10, CP3'12 及び CP3'13 の9系統であった(表2)。このうち T₁ 個体の過半数が抵抗性となる系統は CP3'3 及び CP3'9 の2系統であり, CP3'3 及び CP3'10 の一部については回復型抵抗性を示した。CP3'3 の T₁ 個体から抵抗性の5個体を選抜し, T₂ 世代 (CP3'3-R1~R5) の検定を行ったところ, *Nb*-Tu-CP と同様に全ての個体が TuMV 抵抗性の系統 (CP3'3-R1~R3) と, 抵抗性/感受性が分離する系統 (CP3'3-R4, R5) が得られた。

表2 TuMV-CP3' 遺伝子を導入した*N. benthamiana*形質転換体 T₁及びT₂世代のTuMVに対する反応

親系統	TuMVに対する反応		抵抗性個体 (%)
	抵抗性 (うち回復型)	感受性	
T ₀ 植物			
CP3'1	2	18	10
CP3'2	0	20	0
CP3'3	12 (4)	8	60
CP3'4	4	16	20
CP3'5	2	18	10
CP3'6	1	19	5
CP3'7	0	20	0
CP3'8	0	20	0
CP3'9	10	10	50
CP3'10	2 (2)	18	10
CP3'11	0	20	0
CP3'12	6	14	30
CP3'13	5	14	30
CP3'14	0	20	0
CP3'15	0	20	0
CP3'16	0	20	0
CP3'17	0	20	0
CP3'18	0	20	0
CP3'19	0	20	0
CP3'20	0	20	0
T ₁ 植物			
CP3'3-R1	8	0	100
3-R2	8	0	100
3-R3	8	0	100
3-R4	6	2	75
3-R5	4	4	50

2. Nib 及び VPg 遺伝子を導入した *Nicotiana benthamiana* の TuMV に対する反応

N.benthamiana に TuMV の Nib3' を導入した 20 個体

の再分化個体を得た。これらの形質転換体 (*Nb-Tu-NIb3'*) T₀ 世代から次世代 (T₁ 世代) を自家採種・育成して TuMV 抵抗性検定に供試した (表 3)。その結果, T₁ 世代の多くは CP 遺伝子を導入した場合と同じく TuMV 感受性であったが, NIb3'3, NIb3'7, NIb3'8, NIb3'10, NIb3'12, NIb3'14 及び NIb3'15 の 7 系統では 50~90 % の個体が完全な抵抗性を示した。また, NIb3'3 及び NIb3'10 の中に回復型抵抗性を示す個体が確認された。抵抗性系統 NIb3'3 及び NIb3'7 の T₁ 植物から後代を採種し, カナマイシンによる選抜・育成後, TuMV 抵抗性検定を行った。その結果, 供試個体の全てが抵抗性を示す系統 (NIb3'3-R1~R3, NIb3'7-R1~R3) が得られた。

表 3 TuMV-NIb3' 遺伝子を導入した *N. benthamiana* 形質転換体 T₁ 及び T₂ 世代の TuMV に対する反応

親系統	TuMV に対する反応		抵抗性個体 (%)
	抵抗性 (うち回復型)	感受性	
T ₀ 植物			
NIb3' 1	6	14	30
NIb3' 2	0	20	0
NIb3' 3	18 (5)	2	90
NIb3' 4	0	20	0
NIb3' 5	8	12	40
NIb3' 6	0	20	0
NIb3' 7	18	2	90
NIb3' 8	12	8	60
NIb3' 9	2	18	10
NIb3' 10	15 (5)	5	75
NIb3' 11	0	20	0
NIb3' 12	10	10	50
NIb3' 13	0	20	0
NIb3' 14	14	6	70
NIb3' 15	14	6	70
NIb3' 16	0	20	0
NIb3' 17	0	20	0
NIb3' 18	0	20	0
NIb3' 19	0	20	0
NIb3' 20	0	20	0
T ₁ 植物			
NIb3' 3-R1	10	0	100
3-R2	10	0	100
3-R3	10	0	100
NIb3' 7-R1	10	0	100
7-R2	10	0	100
7-R3	10	0	100

TuMV の VPg 遺伝子についても 20 個体の形質転換 T₀ 世代 (*Nb-Tu-VPg*) を獲得した。T₁ 世代の TuMV 抵抗性検定では, VPg1, VPg2, VPg6, VPg7, VPg8, VPg9, VPg10 及び VPg19 の 8 系統中に抵抗性を示す個体が認められた (表 4)。また, VPg3, VPg4, VPg5 及び VPg10 の 4 系統中に回復型抵抗性を示す個体が確認された。これらのうち 50 % 以上の個体が完全な抵抗

性を示したのは VPg6, VPg7 及び VPg9 の 3 系統であった。

表 4 TuMV-VPg 遺伝子を導入した *N. benthamiana* 形質転換体 T₁ 世代の TuMV に対する反応

親系統	TuMV に対する反応		抵抗性個体 (%)
	抵抗性 (うち回復型)	感受性	
VPg 1	1	9	10
VPg 2	2	8	20
VPg 3	5 (5)	5	50
VPg 4	1 (1)	9	10
VPg 5	6 (6)	4	60
VPg 6	6	4	60
VPg 7	6	4	60
VPg 8	2	8	20
VPg 9	5	5	50
VPg 1 0	10 (9)	0	100
VPg 1 1	0	10	0
VPg 1 2	0	10	0
VPg 1 3	0	10	0
VPg 1 4	0	10	0
VPg 1 5	0	10	0
VPg 1 6	0	10	0
VPg 1 7	0	10	0
VPg 1 8	0	10	0
VPg 1 9	1	9	10
VPg 2 0	0	10	0
非形質転換体	0	10	100

3. TuMV-CP 遺伝子を導入した *Nicotiana benthamiana* のサザンブロット解析

Nb-Tu-CP のうち抵抗性及び感受性を示す各系統のコピー数を解析したところ, T₁ 世代で抵抗性系統と判断した 7 系統 (CP1, CP2, CP9, CP12, CP13, CP19, CP20) のうち CP19 を除く 6 系統で 2 本以上のバンドが認められ, 複数コピーであることが確認された (図 3)。これに対し, 感受性系統では 7 系統中 6 系統 (CP10, CP11, CP14, CP15, CP16, CP17) で単一バンドが, また, 15 % の個体が回復型抵抗性を示した CP18 では 2 本のバンドが検出された。

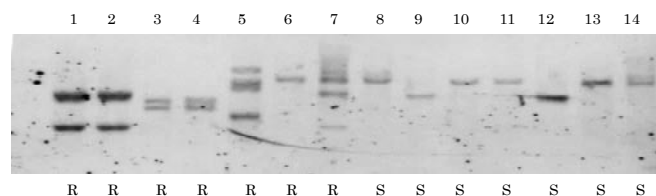


図 3 TuMV-CP 遺伝子を導入した *Nicotiana benthamiana* 形質転換体 T₁ 世代のサザンブロット解析。
1, CP1; 2, CP2; 3, CP9; 4, CP12; 5, CP13; 6, CP19; 7, CP20; 8, CP10; 9, CP11; 10, CP14; 11, CP15; 12, CP16; 13, CP17; 14, CP18。
表現型 R: 抵抗性 S: 感受性

4. 導入遺伝子の発現解析

Nb-Tu-CP の TuMV 抵抗性系統及び感受性系統から

全 RNA を抽出後、ノーザンブロット解析を行った。なお、T₁ 世代の表現型は RNA 抽出用のサンプル葉を採取後にウイルスを接種して特定した。その結果、抵抗性系統である CP1, CP2, CP9, CP12, CP13, CP19 及び CP20 では全ての供試個体で mRNA が検出されな
いか、またはわずかに反応が認められる程度であったのに対し、感受性系統 (CP10, CP11, CP14, CP15, CP16, CP17, CP18) では全ての個体から CP の mRNA が検出された (図 4)。

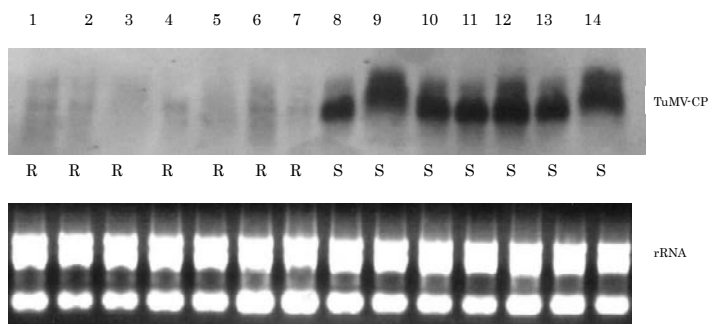


図 4 TuMV-CP 遺伝子を導入した *Nicotiana benthamiana* 形質転換体 T₁ 世代のノーザンブロット解析。

1, CP1; 2, CP2; 3, CP9; 4, CP12; 5, CP13; 6, CP19; 7, CP20; 8, CP10; 9, CP11; 10, CP14; 11, CP15; 12, CP16; 13, CP17; 14, CP18.

表現型 R: 抵抗性 S: 感受性

Nb-Tu-CP3' では CP3'3-R1, CP3'3-R2, 及び CP3'3-R3 を抵抗性系統として選抜し、感受性系統である CP3'2, CP3'7 及び CP3'8 の T₁ 世代と比較した。その結果、全長の CP 遺伝子を導入した場合と同様に感受性系統の供試個体からはいずれも導入遺伝子が明確なシグナルとして検出されるが、抵抗性系統の供試個体からはわずかに反応が認められる程度であった (図 5)。

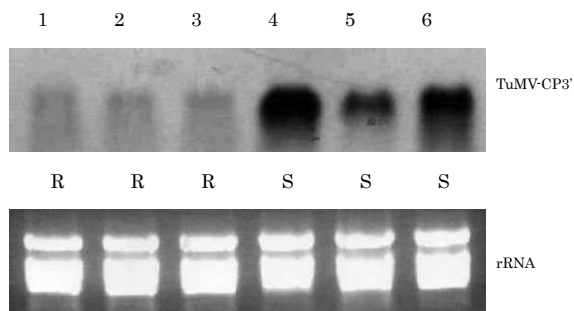


図 5 TuMV-CP3' 遺伝子を導入した *N.benthamiana* T₁ 世代及び T₂ 世代のノーザンブロット解析。

1, CP3'3-R1; 2, CP3'3-R2; 3, CP3'3-R3; 4, CP3'2; 5, CP3'7; 6, CP3'8.

表現 R: 抵抗性 S: 感受性

Nb-Tu-Nib の T₁ 世代では、抵抗性系統である Nib3'3, Nib3'7, Nib3'8 及び Nib3'10 の抵抗性個体では導入遺

伝子が検出されないのに対し、感受性系統である Nib3'2, Nib3'4, Nib3'6, 及び Nib3'11 で導入遺伝子の明確なシグナルが検出された (図 6)。

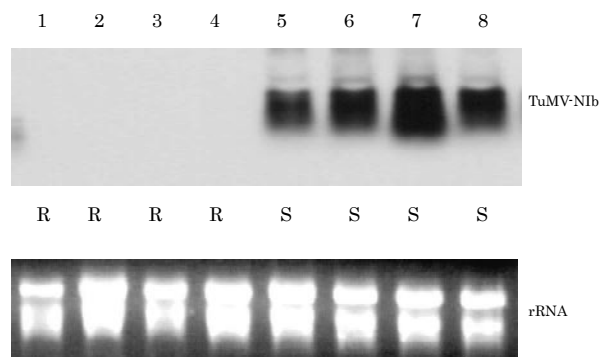


図 6 TuMV-Nib3' 遺伝子を導入した *Nicotiana benthamiana* 形質転換体 T₁ 世代のノーザンブロット解析。

1, Nib3'3; 2, Nib3'7; 3, Nib3'8; 4, Nib3'10; 5, Nib3'2; 6, Nib3'4; 7, Nib3'6; 8, Nib3'11.

Nb-Tu-VPg については VPg1~VPg10 の T₀ 世代及びのノーザンブロット解析を行ったところ、VPg1, VPg3, VPg4, VPg5 の mRNA 検出レベルが高かった。VPg6, VPg7, VPg8 及び VPg10 についてはわずかにシグナルが検出される程度であり、VPg2, VPg9 については検出されなかった (図 7)。

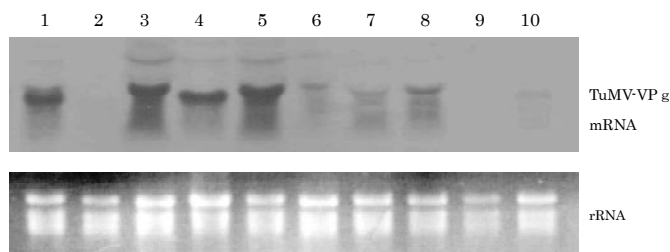


図 7 TuMV-VPg 遺伝子を導入した *N.benthamiana* T₀ 世代のノーザンブロット解析。

1, VPg1; 2, VPg2; 3, VPg3; 4, VPg4; 5, VPg5; 6, VPg6; 7, VPg7; 8, VPg8; 9, VPg9; 10, VPg10.

5. TuMV-CP 遺伝子を導入した *Nicotiana benthamiana* 形質転換体からの siRNA の検出

Nb-Tu-CP から siRNA の検出を試みた。その結果、抵抗性系統 CP12-R1 の T₁ 植物では TuMV 接種前に収集した葉から siRNA が検出されたのに対し、回復型抵抗性を示す系統 CP4 の T₁ 植物では TuMV 接種前には siRNA は検出されず、接種後に病徴を示した後に展開してきた無病徴の葉からは siRNA が検出された。感受

性系統 (CP10-S1) の植物からは siRNA は検出されなかった (図 9)。

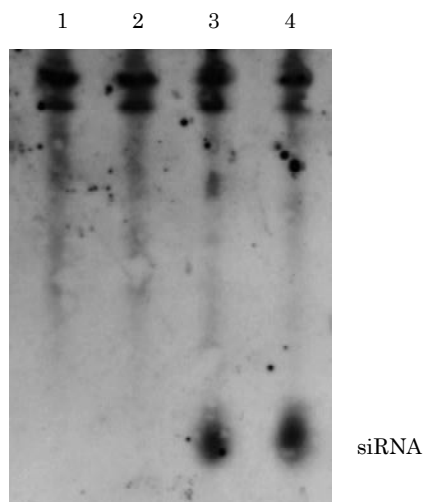


図 9 TuMV-CP 遺伝子を導入した *Nicotiana benthamiana* の TuMV 抵抗性形質転換体に特異的に検出される siRNA.

1, 感受性形質転換体(CP10-S1); 2, 回復型抵抗性形質転換体 (CP4:TuMV 接種前); 3, 回復型抵抗性形質転換体(CP4:TuMV 接種後); 4, 抵抗性形質転換体(CP12-R1: TuMV 接種前).

考 察

TuMV の CP 遺伝子の他, CP 遺伝子の 3'末端側部分塩基配列 (CP3'), N1b 遺伝子の 3'末端側部分塩基配列 (N1b3'), 及び VPg 遺伝子を *N.benthamiana* に導入した形質転換体を作成し, その特性を調べた. CP 導入植物における TuMV に対する反応を調べた結果, 7 系統の T₁ 世代植物で過半数の供試個体が高度抵抗性を示した. *N.benthamiana* は TuMV に対する感受性が高く, 感染すると株全体が萎凋するなど激しい病徴を示すが, CP 遺伝子を導入した形質転換体からは高度な抵抗性を示し, TuMV が感染しない個体が選抜された. CP 遺伝子以外の遺伝子を導入した形質転換植物におけるウイルス抵抗性については, Potyvirus では N1b 遺伝子や VPg 遺伝子, P1 遺伝子, HC-Pro 遺伝子などについて研究が行われた事例がある (Audy et al 1994, Jones et al 1998, Moreno et al 1998, Maki-Valkama et al 2000,

Germundsson et al 2006). 本研究では CP3', N1b3' 及び VPg 遺伝子を導入した場合にも, CP 遺伝子を導入した場合と同様に強い抵抗性を示す系統が得られた. その獲得系統数は, *Nb-Tu-CP3'* では作出した 20 系統中 2 系統 (10%), *Nb-Tu-N1b* では同様に 7 系統 (35%), *Nb-Tu-VPg* では 3 系統 (15%) であった. これらの結果は遺伝子組換えにより TuMV 抵抗性植物を育成する場合, 基本的には導入遺伝子の種類には依存しないことを示している. 本研究で導入した遺伝子は, 全長の CP 遺伝子以外はいずれもタンパク質への翻訳が出来ない遺伝子である. 導入遺伝子由来の mRNA 発現レベルを見ると, 抵抗性系統ではいずれも検出レベルが低いか, または検出されなかった. *Nb-Tu-VPg* では感受性系統と同程度の mRNA が検出される個体が存在したが, これらはいずれも回復型抵抗性を示す個体であった. 反対に, mRNA が検出されないが TuMV 感受性を示す系統が認められた. これらの系統については mRNA の転写抑制 (transcriptional gene silencing) が起こっていることが推察される (Vaucheret and Fagard 2001). CP 遺伝子を導入した TuMV 抵抗性植物からは RNA サイレncing の指標となる導入遺伝子由来の siRNA が検出された (Hamilton and Baulcombe 1999). これらの結果は, 本実験で用いた CP や N1b, VPg などのウイルス遺伝子を導入して抵抗性植物を作成する際に導入遺伝子由来のタンパク質は必要なく, TuMV 遺伝子を導入し, RNA サイレncing を起こしている個体・系統を選抜することにより TuMV 抵抗性植物を作成することが可能であることを示している.

TEV の CP 遺伝子を導入したタバコでは, ウイルスの感染によって RNA サイレncing が誘導される事例が報告されている. この場合, TEV の接種により感染初期に展開した上葉では激しい病徴が現れるが, その後展開する上葉では病徴が軽減し, さらに見かけ上健全な葉が展開してくる. 無病徴の上葉には TEV がほとんど検出されず, さらなる TEV 感染に対して強い抵抗性を示す. このような回復型抵抗性はリカバリーと名付けられている. (Lindbo et al 1993, Dougherty et al 1994). 本研究で作出した形質転換体の中には, 接種後に展開した葉には病徴が見られるが, その後の生育に伴い病徴が消失する回復型抵抗性を示す個体が認めら

れ、TuMVの遺伝子を導入した形質転換体においてもウイルスの感染によりRNAサイレンシングが誘導される場合があることが確認された。

導入遺伝子の長さや抵抗性個体の獲得効率について、Pangら(1997)は*Tomato spotted wilt virus* (TSWV)の長さの異なるN遺伝子断片を*N.benthamiana*に導入した形質転換体を作成し、導入遺伝子長が387~453 bpではTSWV抵抗性系統が得られるが、92~235 bpでは抵抗性系統が得られないこと、また、236~387 bpの遺伝子断片をGFP遺伝子と融合させて導入すれば抵抗性系統が得られることから、ウイルス抵抗性植物を得るには導入遺伝子について一定の長さが必要であることを示した。本研究で用いたTuMV-CP遺伝子の場合、T₂世代の過半数が抵抗性となる系統の獲得効率は全長CP遺伝子(864 bp)を導入した場合は35%であり、その半分の長さに対応するCP3'遺伝子(430 bp)は効率が低かった。このことから単一の遺伝子を導入してウイルス抵抗性植物を獲得するためには少なくとも全長CP遺伝子(864 bp)程度の長さを持つ遺伝子を導入後、選抜する方が効率的である。

*Nb-Tu-CP*のサザンブロット解析の結果、抵抗性系統は2~4コピー、感受性系統は1~2コピーであり、抵抗性系統についてはいずれも複数コピーであった。抵抗性系統のT₁世代では形質が分離するが、その次世代では形質が分離するものと、全ての個体が抵抗性を示すものが得られ、さらに後代について選抜を繰り返すことにより安定してTuMV抵抗性を示す系統が得られた。TuMV-CPの他、CP3'、Ni3'及びVPg遺伝子を導入した*N.benthamiana*でも2回以上の自殖と選抜により全ての個体が抵抗性となる系統が得られ、その後代ではTuMV抵抗性が維持されていた。したがって、各種作物にウイルス遺伝子を導入後、RNAサイレンシングにより抵抗性を示す系統を効率的に獲得するためには自殖できる作物では、その後代から抵抗性個体を選抜することで安定したウイルス抵抗性を示す系統がより効率的に得られるものと考えられる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、ご指導いただいた東京大学大

学院 難波成任教授に深謝の意を表す。

引用文献

- Audy, P., Palukaitis, P., Slack, S. A., and Zaitlin, M. 1994. Replicase-mediated resistance to potato virus Y in transgenic tobacco plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:15-22.
- Beck, D. L., van Dolleweerd, C. J., Lough, T. J., Balmori, E., Voot, D. M., Andersen, M. T., O'Brien, I. E. W., and Forster, R. L. S. 1994. Disruption of virus movement confers broad-spectrum resistance against systemic infection by plant viruses with a triple gene block. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10310-10314.
- Carr, J. P., Marsh, L. E., Lomonosoff, G. P., Sekiya, M. E., and Zaitlin, M. 1992. Resistance to tobacco mosaic virus induced by the 54-kDa gene sequence requires expression of the 54-kDa protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5:397-404.
- Cooper, B., Lapidot, M., Heick, J. A., Dodds, J. A., and Beachy, R. N. 1995. A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility. *Virology* 206:307-313
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., and Helinski, D. R. 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7347-7351.
- Dougherty, W. G., Lindbo, J.A., Smith, H. A., Parks, T. D., Swaney, S., and Proebsting, W. M. 1994. RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:544-552.
- Fuchs, M., and Gonsalves, D. 2008. Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: lessons from realistic field risk assessment studies. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45: 173-202.

- Germundsson, A., and Valkonen, J. P. T. 2006. P1- and VPg-transgenic plants show similar resistance to Potato virus A and may compromise long distance movement of the virus in plant sections expressing RNA silencing-based resistance. *Virus Research* 116:208-213.
- Hamilton, A. J., and Baulcombe, D. C. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286:950-952.
- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffman, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G., and Fraley, R. T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231.
- Jones, A. L., Johansen, I. E., Bean, S. J., Bach, I., and Maule, A. J. 1998. Specificity of resistance to pea seed-borne mosaic potyvirus in transgenic peas expressing the viral replicase (NIb) gene. *J. Gen. Virol.* 79:3129-3137.
- Lindbo, J. A., and Dougherty, W. G. 2005. Plant pathology and RNAi: a brief history. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:191-204.
- Lomonosoff, G. P. 1995. Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:323-343.
- Maki-Valkama, T., Valkonen, J. P. T., Kreuze, J. F., and Pehu, E. 2000. Transgenic resistance to PVY^O associated with post-transcriptional silencing of P1 transgene is overcome by PVY^N strains that carry highly homologous P1 sequences and recover transgene expression at infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:366-373.
- Moreno, M., Bernal, J. J., Jimenez, I., and Rodriguez-Cerezo, E. 1998. Resistance in plants transformed with the P1 or P3 gene of tobacco vein mottling potyvirus. *J. Gen. Virol.* 79:2819-2827.
- Nomura, K., Ohshima, K., Anai, T., Uekusa, H., and Kita, N. 2004. RNA-silencing of the introduced coat protein gene of *Turnip mosaic virus* confers the broad spectrum resistance in transgenic Arabidopsis. *Phytopathology* 94:730-736.
- Palukaitis, P., and Zaitlin, M. 1997. Replicase-mediated resistance to plant virus disease. *Adv. Virus Res.* 48:349-377.
- Pang, S-Z., Jan, F-J., and Gonsalves, D. 1997. Nontarget DNA sequences reduce the transgene length necessary for RNA-mediated tospovirus resistance in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:8261-8266.
- Prins, M., Laimer, M., Noris, E., Schubert, J., Wassenegger, M., Tepfer, M. 2008. Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Mol. Plant. Pathol.* 9: 73-83.
- Sijen, T., Wellink, J., Hiriart, J. B., and van Kammen, A. 1996. RNA-mediated virus resistance: Role of repeated transgenes and delineation of targeted regions. *Plant Cell* 8:2277-2294.
- Swaney, S., Powers, H., Goodwin, J., Silva Rosales, L., and Dougherty, W. G. 1995. RNA-mediated resistance with nonstructural genes from the tobacco etch virus genome. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8:1004-1011.
- Tomlinson, J. A. 1987. Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. *Ann. Appl. Biol.* 110:661-681.
- Vaucheret, H., and Fagard, M. 2001. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet.* 17:29-35.