

# 微細穿孔葉免疫ブロッキング法の開発及びウイルスの RNA サイレンシング

## ング抑制タンパク質発現に対するサリチル酸シグナルの影響

生物資源科学専攻 植物育種学講座 植物病原学 村上 泰基

### 1. はじめに

植物免疫の重要な因子の一つにサリチル酸 (salicylic acid) がある。サリチル酸の生合成が起きますと抵抗性が誘導され病原体の増殖を妨げるようになり、また全身獲得抵抗性と呼ばれる感染部位以外の組織における抵抗性上昇が起きることが知られている。全身獲得抵抗性誘導時の病原体の増殖を妨げるメカニズムについてはまだ良く分かっていない。以前の研究で、タバコのカルモジュリン様タンパク質の一つである rgs-CaM が全身獲得抵抗性誘導時に増強するウイルス抵抗性に関わっていることが報告された。一方、この rgs-CaM はウイルスの RNA サイレンシング抑制剤 (RSS) と結合しオートファジーによる分解に導くことが報告されている。そこで私は、全身獲得抵抗性誘導時には、rgs-CaM による RSS の分解が活性化されることでウイルス抵抗性が増強しているのではないかと仮説を立てた。RSS を発現するタバコ植物体及び BY-2 培養細胞を用い、サリチル酸アナログである BTH の処理によって全身獲得抵抗性を誘導し、この時 RSS 分解が活性化されるのか検証した。

### 2. 方法

従来のハンマーブロッキング法ではウイルス RSS の一つである HC-Pro を発現する形質転換タバコ葉で HC-Pro タンパク質を検出することができなかった。そこでブロッキング前の葉の穿孔処理、PVDF 膜の使用、発色に代えて化学発光による検出するという改良により検出できることを見出し、これを微細穿孔葉ブロッキング免疫検定法と名付けた。この方法をタバコ植物体における RSS の検出に用い、BY-2 培養細胞からの検出には免疫染色を用いた。

### 3. 結果と考察

RSS である HC-Pro を発現するタバコ植物体に BTH を塗布しその後上葉に水をインフィルトレーションしてストレスを与えると、HC-Pro の蓄積量が特異的に低下したが、オートファジーによるタンパク質分解阻害剤である 3MA の水溶液を注入すると、蓄積量の低下が抑えられた。オートファジーで分解されることが分かっている rgs-CaM についても同様の結果が得られたことから、HC-Pro の水ストレスによる分解はサリチル酸シグナル誘導後に活性化されることが示唆された。同様に別の RSS である 2b を発現する BY-2 培養細胞に BTH を添加した時も 2b の蓄積量が低下した。

### 4. まとめ

上記の結果から、一次感染に伴うサリチル酸シグナルにより全身獲得抵抗性が誘導されている時は rgs-CaM による RSS 分解が活性化されているために、二次感染したウイルスの RSS の働きが抑えられることが示唆された。そのため RNA サイレンシングにより有効にウイルス感染が阻害され、ウイルス抵抗性が増強しているのではないかと考えられる。