

ウイルスに対する植物の抵抗性機構に関する研究

石橋 和大 (農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門)

bashi@affrc.go.jp

はじめに

植物ウイルス病の防除は農業における重要な課題であるが、植物ウイルスに有効な農薬はなく、抵抗性遺伝子を導入した抵抗性品種の育成が有効な手段となっている。抵抗性遺伝子は、作物の近縁野生種などに見つかることが多く、野生の植物がウイルスに対抗する手段として獲得したものと考えられる。これまでに同定されたウイルス抵抗性遺伝子の多くは、共通の一次構造(ヌクレオチド結合領域—ロイシンリッチ反復配列)を持ち、ウイルスの感染を認識して植物の防御機構を活性化することによりウイルス増殖を抑制する。一方、これとは異なる配列をもつ抵抗性遺伝子も近年報告されている。植物がもつウイルス抵抗性機構の多様性を理解することは、抗ウイルス戦略の幅を広げることに繋がると考えられる。私はトマトのトマトモザイクウイルス(ToMV)抵抗性遺伝子 *Tm-1* を同定し、*Tm-1* による独特なウイルス抵抗性機構を明らかにした。また、進化速度の異なるウイルスと植物がどのように共進化してきたか、ウイルスがなぜ限られた範囲の宿主にしか感染することができないかについても知見を得ることができたので紹介したい。

ToMV 抵抗性遺伝子 *Tm-1*

Tm-1 は野生種トマト *Solanum habrochaites* に由来し、商業用のトマト品種にも導入されている。私が研究を始める前に、*Tm-1* による ToMV 抵抗性はプロトプラストでも有効であること、防御反応の活性化が起こらないこと、*Tm-1* を打破する ToMV 変異株がウイルスの複製を司るタンパク質(複製タンパク質)のコード領域内に変異をもつことなどが報告されており、*Tm-1* は他の多くのウイルス抵抗性遺伝子とは作用機構を異にすること、想定される作用機構としてウイルスの複製タンパク質に作用して複製を阻害することが示唆されていた。しかし、*Tm-1* 遺伝子は染色体上の組換え頻度の低い領域に座乗するため、ポジショナルクローニングが成功していなかった。

2004年に、ToMVのゲノムRNAの複製過程を試験管内で再現する実験系が報告された¹⁾。*Tm-1*がToMV RNAの複製を阻害しているとするならば、*Tm-1*によるToMV RNA複製の阻害が試験管内系で再現できる可能性が考えられた。そこで私は、*Tm-1*をもつトマトより培養細胞ラインを樹立し、この細胞由来の抽出液を試験管内ToMV RNA翻訳・複製系に加えたときにToMV RNAの複製が阻害されることを見出した。活性を指標にウイルス複製阻害タンパク質を各種クロマトグラフィー等によって精製し、同定した。遺伝学的な解析等により、当該タンパク質は*Tm-1*遺伝子産物そのものであることがわかった²⁾。これは、植物



図1. ToMV感染トマト(左)と *Tm-1*を有するToMV抵抗性トマト(右)

の病害抵抗性遺伝子を生化学的に同定した現在まで唯一の例である。

Tm-1 は ToMV 複製タンパク質に結合してウイルス複製複合体の形成を阻害する

Tm-1 遺伝子と類似の配列をもつ遺伝子は、植物のみならず一部の細菌やカビにも保存されていたものの、それらはいずれも機能が解明されていないものであったため、配列から *Tm-1* の機能を推定することはできなかった。*Tm-1* は ToMV の複製タンパク質に作用すると考えられたことから、*Tm-1* と複製タンパク質が結合するか調べたところ、*Tm-1* は野生型 ToMV の複製タンパク質と結合し、抵抗性打破変異株の複製タンパク質とは結合しなかった²⁾。したがって、*Tm-1* は ToMV の複製タンパク質と結合することによって複製を阻害し、ウイルスは *Tm-1* との結合を回避するよう進化することによって抵抗性を打破したものと考えられた。

ToMV RNA の複製は、宿主の膜上に形成される複製複合体と呼ばれる高分子量複合体によって行われる³⁾。複製複合体には複製タンパク質と複製の鋳型となるゲノム RNA のほか、多くの宿主タンパク質も含まれる。試験管内 ToMV RNA 複製系において、*Tm-1* は既に形成された ToMV 複製複合体による RNA 複製反応を阻害しなかったこと、複製が阻害された時には複製タンパク質が複製複合体の形成途中と考えられる状態で蓄積したことから、*Tm-1* は複製タンパク質に結合することにより、複製複合体の形成を阻害すると考えられた^{4,5)}。

ToMV と *Tm-1* の競争的共進化

Tm-1 は打破されやすいことで知られ、抵抗性品種を導入した圃場に、ほどなく抵抗性打破変異ウイルスが出現したことが報告されている。それにも関わらず、野生種トマトが *Tm-1* を備えている理由を探るため、*S. habrochaites* がもつ *Tm-1* の塩基配列を調べた。*Tm-1* は 754 アミノ酸残基からなるタンパク質だが、その中の比較的小さな領域 (79 番目から 112 番目まで) が正の選択 (アミノ酸配列を変える方向に働く自然選択) を受けていることがわかった⁶⁾。このことは、当該領域のアミノ酸配列がウイルスに対抗するために急速に変化したことを示唆する。また、*S. habrochaites* の中には、より強力に ToMV 複製を阻害する *Tm-1* 対立遺伝子 (*Tm-1^{91T}*) を持つ個体も存在し、*Tm-1* は阻害活性を強めるように進化してきた可能性が考えられた。一方、ToMV を接種した *S. habrochaites* から *Tm-1^{91T}* をもつ打破する ToMV 変異株も出現した。ToMV 感受性 (*Tm-1* をもたない) 宿主における各 ToMV 変異株の増殖能を調べたところ、野生型 ToMV > *Tm-1* 打破変異株 > *Tm-1^{91T}* 打破変異株の順に増殖能が高いことがわかった。したがって、ToMV は *Tm-1* による抵抗性を打破するために代償を払っており、感受性宿主に感染すると野生型に戻る方向に進化するために打破変異がウイルス集団に定着しにくく、例え打破されやすくとも *Tm-1* をもつことは植物にとってメリットとなると考えられた。

次に *Tm-1* タンパク質の立体構造解析を試みた。大腸菌で発現した *Tm-1* タンパク質断片の構造を X 線結晶回折により決定した⁷⁾。*Tm-1* 断片は二量体として存在し、正の選択を受けた

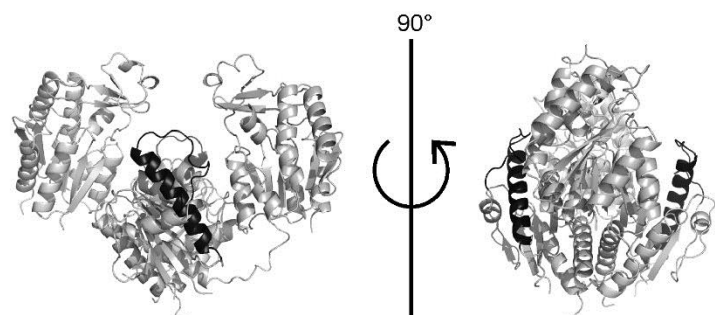


図 2. *Tm-1* (1-431) の結晶構造
正の選択を受けた領域 (79-112) を黒で示した。

79–112 番目のアミノ酸残基は分子表面に露出しており、この部分で ToMV 複製タンパク質と結合すると考えられた (図 2)。さらに、Tm-1 断片と ToMV 複製タンパク質ヘリカーゼドメイン (ToMV-Hel) の複合体の結晶構造を決定したところ、予想通り Tm-1 は正の選択領域を介して ToMV-Hel と結合していた。また、*Tm-1* 抵抗性打破変異株において変化している ToMV-Hel のアミノ酸残基も Tm-1 との直接の結合に関与していた。これらの結果より、Tm-1 は分子表面を変化させて ToMV 複製タンパク質と結合するよう進化したこと、ToMV は Tm-1 の標的となるアミノ酸残基を変化させることにより結合から逃れて抵抗性を打破していることがわかった⁷⁾。

ウイルスの宿主域が制限されるしくみ

ウイルスは限られた範囲の宿主生物種にのみ感染する。ウイルスがある生物種のどの個体にも感染できないとき、その生物種を非宿主とよぶ。あるウイルスにとっては、ほとんどの生物種が非宿主である。非宿主にウイルスを接種しても見かけ上何も起こらず、また遺伝解析ができないため、ウイルスが非宿主植物に感染できない原因はわかっていなかった。

ToMV 感受性トマトには *Tm-1* の対立遺伝子 *tm-1* が存在する。*tm-1* は、Tm-1 とアミノ酸配列で 97% の相同性を有しているものの、ToMV の複製タンパク質と結合せず、ToMV RNA 複製も阻害しなかった。ToMV と近縁のタバコ緑斑モザイクウイルス (TMGMV) とトウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) はいずれもナス科植物を自然宿主とするウイルスであるが、トマトには感染できないことが知られていた。私は、TMGMV および PMMoV がトマトに感染できない一因が *tm-1* による増殖阻害にあることを明らかにした⁸⁾。これは、非宿主植物にウイルスが感染できない原因の最初の報告となった。*tm-1* にウイルス増殖抑制阻害能がありトマトに感染できないウイルスの増殖を抑制していることは、ToMV はトマトに適応する過程で *tm-1* による阻害から逃れるように進化してきたことを示唆している。

tm-1 を発現する形質転換タバコに TMGMV を接種することにより、*tm-1* による阻害を打破する変異 TMGMV (T894M,F970Y 変異株) を得ることができた。T894M,F970Y 変異株は複製タンパク質ヘリカーゼドメインにアミノ酸置換を有しており、*tm-1* との結合能が低下していた。この TMGMV 変異株をトマトに接種したところ、低効率ながら全身感染し、壊死を伴う激しい病徴を示した (図 3 上)。TMGMV はタバコ近縁種の *Nicotiana benthamiana* に感染すると著しく増殖して植物を枯死させるが、T894M,F970Y 変異株は *N. benthamiana* に顕著な病原性を示さなかった (図 3 下)。TMGMV を含むトバモウイルス属ウイルスの複製タンパク質は、複製を行うだけでなく、宿主の防御機構である RNA サイレンシングを抑制する働きももつ。T894M,F970Y 変異株の複製タンパク質を解析したところ、RNA サイレンシング抑制能が低下していることがわかった⁹⁾。すなわち、非宿主であるトマトにおける複製能の獲得と引き換えに、宿主への感染に重要な RNA サイレンシング抑制能を喪失したと言える。ウ

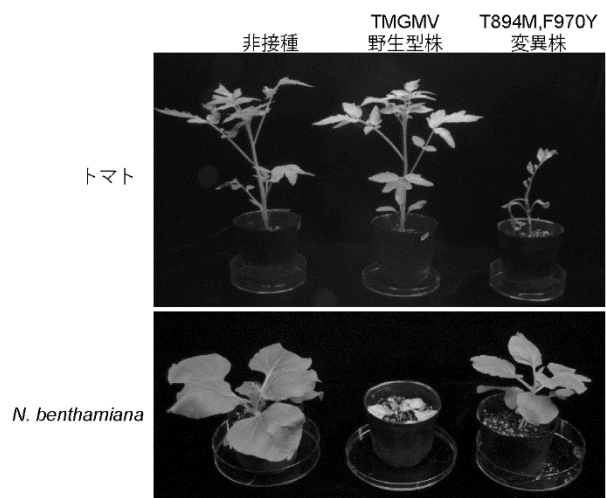


図 3. 野生型 TMGMV あるいは T894M,F970Y 変異株を接種したトマト (上) および *N. benthamiana* (下) の病徴

ウイルスゲノムは小さく保たれた中に多くの情報を詰め込む必要があるため、多くのウイルスタンパク質が多機能であることが知られているが、ここで得られた結果より、ウイルスタンパク質が多機能であることはウイルスの進化を制約する要因であり、これにより宿主域が制限されていることが明らかとなった。

おわりに

私が本研究を開始したのは大学3年であった2001年であり、2008年に *Tm-1* 遺伝子の同定に関する研究で博士号を頂いた。その後も、博士研究員および農業生物資源研究所（現農業・食品産業技術総合研究機構）任期付研究員として研究を継続し、分子進化学や構造生物学などの切り口から植物のウイルス抵抗性機構の新たな一面を明らかにすることができた。近年若手研究者を取り巻く環境は厳しく、長期間継続的に研究を行うことが難しくなっているなかで、10年以上に渡り一つの遺伝子の研究を継続できたことは、多くの幸運と周りの方々のご理解に恵まれたことが大きい。この度の日本農学進歩賞受賞を励みに、ウイルス病の被害軽減に貢献できるよう、今後も植物ウイルスの研究を継続していきたい。

謝辞

本研究の遂行にあたり、農研機構生物機能利用研究部門植物微生物機能ユニットの石川雅之ユニット長には終始温かいご指導を賜りました。*Tm-1* の立体構造は農研機構高度解析センターの加藤悦子博士および立命館大学の松村浩由教授との共同研究により決定することができました。野生種トマトにおける *Tm-1* の分子進化学的解析では東北大学の宮下脩平助教および東京大学の岸野洋久教授にご助言いただきました。その他多くの共同研究者や同僚、研究補助員の方々に支えていただき、本研究を行うことができました。この場をお借りして心より感謝申し上げます。最後に、本賞にご推薦くださいました日本植物病理学会の夏秋知英会長をはじめ、関係諸先生方に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Komoda K., Naito S. and Ishikawa M.: Proc Natl Acad Sci USA 101:1863-1867 (2004).
- 2) Ishibashi K., Masuda K., Naito S., Meshi T. and Ishikawa M.: Proc Natl Acad Sci USA 104:13833-13838 (2007).
- 3) Ishibashi K. and Ishikawa M.: Annu Rev Phytopathol 54: 55-78 (2016).
- 4) Ishibashi K. and Ishikawa M.: J Virol 87(14):7933-7939 (2013).
- 5) Ishibashi K. and Ishikawa M.: Curr Opin Virol 9:8-13 (2014).
- 6) Ishibashi K., Mawatari N., Miyashita S., Kishino H., Meshi T. and Ishikawa M.: PLoS Pathog 8(10):e1002975 (2012).
- 7) Ishibashi K., Kezuka Y., Kobayashi C., Kato M., Inoue T., Nonaka T., Ishikawa M., Matsumura H. and Katoh E.: Proc Natl Acad Sci USA 111(33):E3486-E3495 (2014).
- 8) Ishibashi K., Naito S., Meshi T. and Ishikawa M.: Proc Natl Acad Sci USA 106:8778-8783 (2009).
- 9) Ishibashi K., Meshi T. and Ishikawa M.: J Virol 85:1893-1895 (2011).