

植物ウイルスの分子耐性機構に関する研究

山次 康幸 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

ayyamaji@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

はじめに

植物ウイルス病による世界の作物生産損失額は年間 5 兆円を超えると予想されているが、潜在的な被害はより大きいと考えられており、局所的な産業への影響も多大である。しかし、植物ウイルスには特効薬となる化学薬剤は存在せず、抵抗性育種や媒介生物の防除、弱毒ウイルスなど時間と手間をかけた耕種的防除を行って、ウイルス病の被害を軽減させているのが実情である。植物ウイルスによる被害を効率よく抑制するためには、罹病作物から原因となるウイルスを迅速かつ正確に同定・診断して的確な予防対策を講じることが不可欠であるが、分子生物学的解析により得られた知見を応用して新規ウイルス病防除戦略を構築しようとする試みも重要である。本研究では我が国で発生する植物ウイルス病の同定を行い、植物ウイルス診断に向けた実用的知見を得た。さらに、植物・ウイルス間の分子相互作用を解明することにより、ウイルス病に対する新規抵抗性分子育種に向けた基盤知見を得た。

植物ウイルスの同定と系統分類に関する研究

植物ウイルスに感染した植物はモザイク、萎縮、壊死など特徴的な病徴を生ずるが、生理病による症状と類似していたり、植物の育成環境や条件により病徴の変化や無病徴となる場合があるため診断が難しい。ウイルスは光学顕微鏡では観察できないため、植物ウイルス病の診断は一般に電子顕微鏡観察や、免疫学的手法、遺伝子診断、検定植物・原宿主への接種試験などを組み合わせて行われるが、最近では PCR 法、LAMP 法などの遺伝子診断やイムノクロマト法などの簡易免疫学的手法が診断の中心となりつつある。遺伝子診断は対象ウイルスのゲノム配列が既知であることが前提であるが、免疫学的手法においても使用する抗体の抗原となるウイルスタンパク質はウイルスの遺伝子配列に基づいて大腸菌内で調整されるのが主流である。このように植物ウイルスの診断のためには当該ウイルスの遺伝子配列の同定が不可欠である。

そこで、本研究では我が国で発生する植物ウイルスの遺伝子配列の同定を行った。まずユリに感染して花卉生産に大きな被害を与える lily mottle virus (LMoV) の外被タンパク質配列を解読した¹⁰⁾。LMoV は *Potyvirus* 属のウイルスであり、チューリップに感染することにより花卉に斑入りを生ずることから、同じくチューリップの花卉に斑入りを生ずる tulip breaking virus と同種と考えられてきたが、本研究により別種ウイルスであることを明らかにした。次いでそれぞれチューリップとマメ科植物に感染して被害を与える tulip virus X (TVX) と white clover mosaic virus (WCIMV) という二種類の *Potexvirus* 属ウイルスの同定を行い、全長ゲノム配列を解読した^{8,9)}。これらの解析を通じて、従来 *Potexvirus* 属ウイルスにおいて外被タンパク質の遺伝子配列を元に行われていた分類体系を見直し、複製酵素遺伝子を基準とした新たな分類基準を提案した。以上の研究により、植物ウイルス診断の基盤知見を得ると共にウイルス種の分類基準に新たな示唆を加えた。

植物ウイルス感染に関わる感受性遺伝子に関する研究

植物ウイルスは絶対寄生性の病原体であり、植物に感染する際には宿主因子を必要とするため、それらウイルス感染に必要な遺伝子の変異体植物には感染できなくなる。このような遺伝子を受感性遺伝子、それらの劣性変異により生じる抵抗性を劣性抵抗性と呼ぶ。従ってウイルスが感染

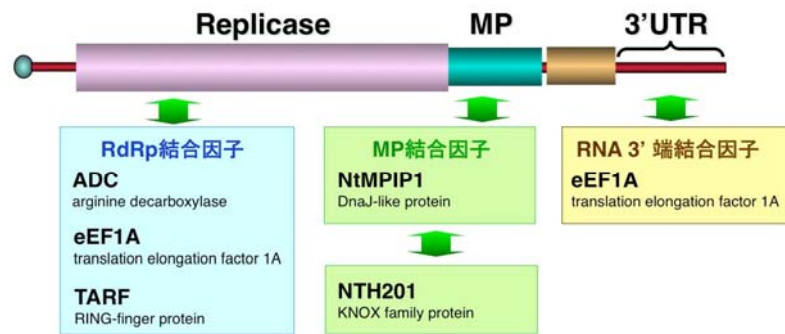


図1. TMV タンパク質と結合する宿主因子

に必要とする感受性遺伝子を解明し、植物・ウイルス間相互作用を明らかにすることにより劣性抵抗性品種開発の基礎知見になると考えられる。

まず、モデルウイルスであるタバコモザイクウイルス (tobacco mosaic virus, TMV) の複製に関わる宿主因子の解析を行った (図1)。酵母 two-hybrid 法などを用いて TMV 複製酵素と結合する因子を探索した結果、複製酵素結合因子として翻訳伸長因子 eEF1A を単離した⁶⁾。eEF1A は TMV 複製酵素の MET ドメインを介して結合することを示し、かつ eEF1A と複製酵素の結合がゲノム RNA 非依存的であることを示した。次いで、virus-induced gene silencing (VIGS) 法などを用いて eEF1A が TMV の RNA 複製を促進することを明らかにした³⁾。eEF1A は動物や細菌の RNA ウイルスゲノムの複製にも関与することが示されており、本研究により RNA ウイルスが動物・植物・細菌を問わず普遍的に eEF1A を利用する可能性が示唆された。また、同じく複製酵素と結合する因子として arginine decarboxylase (ADC) を見出した⁷⁾。ADC はその C 末端を介して複製酵素の HEL ドメインと結合することを示し、ADC が TMV 複製酵素のオリゴマー形成を阻害する可能性を示唆した。

一方で、KNOX ファミリータンパク質の1種である NTH201 が TMV の細胞間移行を促進する働きを持つことを明らかにした⁵⁾。NTH201 の発現を抑制するとウイルス細胞間移行が抑制され、形質転換植物で NTH201 を高発現させるとウイルス細胞間移行が促進された。NNOX1 ファミリータンパク質は植物自身がコードするタンパク質でありながら、ウイルス移行タンパク質 MP と同様に植物細胞内を移行可能である点で興味深い。さらに、TMV の MP と結合するシャペロンタンパク質 NtMPIP1 の単離によりそのメカニズムの一端を明らかにした⁴⁾。NtMPIP1 が MP・NTH201 の双方と結合することにより MP と NTH201 の間を架橋することを明らかにし、また NtMPIP1 も NTH201 と同様に TMV の細胞間移行を促進する働きを持つことから、これらが協調的に相互作用しながら TMV の細胞間移行を促進することが示唆された。

植物ウイルスに対する防御応答メカニズムに関する研究

抵抗性育種による耕種的防除は化学農薬と同様に植物病害の防除戦略として効果的である。植物ウイルスに対しては抵抗性遺伝子座が解析されている抵抗性作物品種だけでも数百種に上るが、これまでに単離された優性抵抗性遺伝子の数は限られている。そのため新たに抵抗性遺伝子を単離し、防御応答メカニズムを解析することが重要である。

本研究ではシロイヌナズナの多数のエコタイプの中から *Potexvirus* 属の *plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) に抵抗性を示すエコタイプを発見し、原因となる抵抗性遺伝子 JAX1 を同定した¹⁾。JAX1 は

Potyvirus 属ウイルスに対する抵抗性遺伝子 RTM1 と同じく、レクチンの1種であるジャカリン様タンパク質をコードしていた。植物ウイルスに対しては、従来からウイルス抵抗性遺伝資源として用いられてきた真正抵抗性と RNA レベルでウイルスを分解する RNA サイレncing の2種類が主要な抵抗性であると考えられてきたが、JAX1 による抵抗性は真正抵抗性、RNA サイレncing のいずれとも異なる新たな抵抗性であることを見出し、これを「レクチン抵抗性」と名付けた (図2)。

一方で、TMV に対する防御応答遺伝子も明らかにした。複製酵素の POL ドメインと結合する因子として単離した TARF はユビキチンリガーゼに特有の RING finger モチーフをもつタンパク質であり、VIGS 法などを用いて TARF が TMV の増殖を阻害する働きを持つことを明らかにした²⁾。TARF は TMV の接種により迅速な発現誘導を受けたことから、TARF はウイルス感染により誘導されるウイルス増殖抑制遺伝子であると考えられた (図3)。

おわりに

本研究では我が国で発生する植物ウイルス病の同定を行い、植物ウイルス診断に向けた知見を得るとともに、植物ウイルスの感染に必要な遺伝子群、植物ウイルスの感染を抑制する遺伝子群を解明した。今後はそれぞれの遺伝子について、関連因子の検討も行いながらウイルス増殖のみを特異的に抑制する戦略の構築が必要であると考えている。またこれら遺伝子群がより幅広い植物ウイルスに与える機能の普遍性についても検証していきたい。さらに植物がコードする標的遺伝子の機能を効率的に抑制したり、増強させる技術の開発が必要であり、これら複数の基礎的知見と技術開発の融合を通じて、ウイルス抵抗性品種の分子育種を目指したい。

謝辞

本研究を行うにあたり、東京大学大学院農学生命科学研究科の日比忠明名誉教授、難波成任教授には終始懇切なご指導とご鞭撻を賜り、心より感謝申し上げます。東京大学大学院農学生命科学研究科植物病理学研究室、同大学院新領域創成科学研究科資源生物創成学研究室における様々な場面でご協力・ご助言を頂いた研究者諸氏、学生諸氏に深く御礼申し上げます。最後に本賞にご推薦頂きました

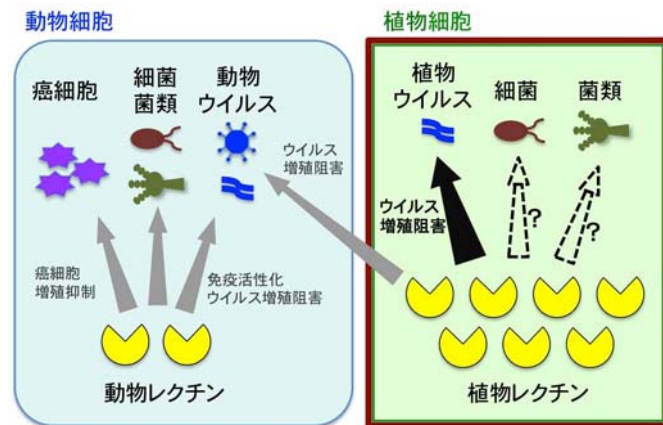


図2. レクチン抵抗性発見の意義

動物レクチンは癌細胞増殖抑制・免疫活性化・ウイルス増殖阻害の機能を持つことが明らかになっていた。植物レクチンの一部も動物ウイルスの増殖を阻害することが明らかになっていた。本研究では植物レクチンが「植物ウイルスの増殖を阻害する」という植物における機能を明らかにした。

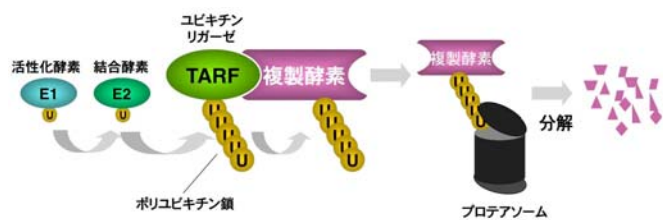


図3. TARF による TMV 複製酵素分解仮説

ユビキチンリガーゼはユビキチン・プロテアソーム系の分解ターゲットとなるタンパク質と結合して認識する。TARF の働きにより複製酵素が分解され、TMV の増殖が抑制されるモデル。

日本植物病理学会の関連の諸先生方に深く感謝申し上げます。

引用文献

1. Yamaji, Y., Maejima, K., Ozeki, J., Komatsu, K., Shiraish, T., Okano, Y., Himeno, M., Sugawara, K., Neriya, Y., Minato, N., Miura, C., Hashimoto, M., Namba, S. (2012) Lectin-mediated resistance impairs plant virus infection at the cellular level. **Plant Cell**, 24, 778-793.
2. Yamaji, Y., Hamada, K., Yoshinuma, T., Sakurai, K., Yoshii, A., Shimizu, T., Hashimoto, M., Suzuki, M., Namba, S., Hibi, T. (2010) Inhibitory effect on the tobacco mosaic virus infection by a plant RING finger protein. **Virus Res.**, 152, 50-57.
3. Yamaji, Y., Sakurai, K., Hamada, K., Komatsu, K., Ozeki, J., Yoshida, A., Yoshii, A., Shimizu, T., Namba, S., Hibi, T. (2010) Significance of eukaryotic translation elongation factor 1A in tobacco mosaic virus infection. **Arch. Virol.**, 155, 263-268.
4. Shimizu, T., Yoshii, A., Sakurai, K., Hamada, K., Yamaji, Y., Suzuki, M., Namba, S., Hibi, T. (2009) Identification of a novel tobacco DnaJ-like protein that interacts with the movement protein of tobacco mosaic virus. **Arch. Virol.**, 154, 959-967.
5. Yoshii, A., Shimizu, T., Yoshida, A., Hamada, K., Sakurai, K., Yamaji, Y., Suzuki, M., Namba, S., Hibi, T. (2008) NTH201, a novel class II KNOTTED1-like protein, facilitates the cell-to-cell movement of tobacco mosaic virus in tobacco. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, 21, 586-596.
6. Yamaji, Y., Kobayashi, T., Hamada, K., Sakurai, K., Yoshii, A., Suzuki, M., Namba, S., Hibi, T. (2006) In vivo interaction between Tobacco mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase and host translation elongation factor 1A. **Virology**, 347, 100-108.
7. Shimizu, T., Yamaji, Y., Ogasawara, Y., Hamada, K., Sakurai, K., Kobayashi, T., Watanabe, T., Hibi, T. (2004) Interaction between the helicase domain of the tobacco mosaic virus replicase and a tobacco arginine decarboxylase. **J. Gen. Plant Pathol.**, 70, 353-358.
8. Nakabayashi, H., Yamaji, Y., Kagiwada, S., Ugaki, M., Namba, S. (2002) The complete nucleotide sequence of a Japanese isolate of White clover mosaic virus strain RC. **J. Gen. Plant Pathol.**, 68, 173-176.
9. Yamaji, Y., Kagiwada, S., Nakabayashi, H., Ugaki, M., Namba, S. (2001) Complete nucleotide sequence of Tulip virus X: Border between species and strains within the genus Potexvirus. **Arch. Virol.**, 146, 2309-2320.
10. Yamaji, Y., Lu, X., Kagiwada, S., Oshima, K., Namba, S. (2001) Molecular evidence that a lily-infecting strain of Tulip breaking virus from Japan is a strain of Lily mottle virus. **Eur. J. Plant Pathol.**, 107, 833-837.

Molecular biological analysis on resistance mechanisms to plant viruses

Yasuyuki Yamaji (Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

ayyamaji@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp