

植物の広域ウイルス劣性抵抗性遺伝子の発見とその発現機構の解明

橋本 将典 (静岡大学大学院農学領域)

hashimoto.masayoshi@shizuoka.ac.jp

要旨

植物ウイルスは、宿主植物の細胞内で多くの宿主因子を収奪・利用して増殖する絶対寄生性の病原体である。その特性ゆえに植物ウイルスに有効な薬剤は開発されておらず、防除には抵抗性を持つ作物品種の利用が有効である。劣性抵抗性は、ウイルス増殖に利用される宿主因子の遺伝子に生じた劣性（潜性）の変異により生じる抵抗性機構であり、植物ウイルスに対する抵抗性品種に広く利用されているが、その適用範囲は一部のウイルスのみに限られてきた。本研究では、農業生産に大きな被害を起こしているポテックスウイルスに対して劣性抵抗性が知られていない点に着目し、劣性抵抗性を示す変異植物系統の特定を基点として、2つの新規の劣性抵抗性遺伝子を見出した。これらの劣性抵抗性は、いずれも複数のポテックスウイルスの感染を低下させる広域性を示した。また、劣性抵抗性の発現機構を明らかにし、それぞれが異なる感染過程を阻害することを明らかにした。

はじめに

植物ウイルスは、農作物に感染して品質の低下や収量の減少を招き、農業生産に深刻な被害を引き起こしている。さらに、ヒトやモノの移動のグローバル化や地球温暖化を背景として、新たな植物病害虫が海外から侵入するリスクが高まっている¹⁾。特に植物ウイルスでは、ウメに発生したウメ輪紋ウイルス (plum pox virus) が記憶に新しい²⁾。植物ウイルスの防除には、被害株の速やかな除去や媒介昆虫の防除のほか、弱毒ウイルスや抵抗性品種の利用が有効である。海外からの病害虫の侵入や新たな植物病の発生リスクに備えて、診断・防除技術や抵抗性品種の開発に役立つ知見を得るための基盤的な研究が重要である。

ウイルスに対する抵抗性品種には、植物がウイルスの侵入に対して進化的に獲得してきた抵抗性機構が利用される。そのような植物が備えるウイルス抵抗性機構のうち、劣性抵抗性は遺伝学的に劣性（潜性）の植物遺伝子により規定され、ウイルス抵抗性品種の約半数を占めている³⁾。劣性抵抗性は、宿主因子を利用して増殖するという植物ウイルスの特性⁴⁾を利用したものであり、その原因遺伝子の多くは翻訳開始因子をコードする *eukaryotic translation initiation factor 4E* (*eIF4E*)、*eIF4G* およびそれらのアイソフォームである^{5,6)}。しかし、翻訳開始因子を介した劣性抵抗性は、ポティウイルスとその類縁のウイルスのみに適用範囲が限定されてきた。

ポテックスウイルスは、48種が分類される植物ウイルスの一群である⁷⁾。ポテックスウイルスには、海外のトマト生産に大きな被害を起こしている pepino mosaic virus (PepMV) や、国内外の花卉生産で問題となっている plantago asiatica mosaic virus (PlAMV)、cymbidium mosaic virus (CymMV) などが知られている。本研究では、劣性抵抗性品種が発見されていないポテックスウイルスに対して、モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いて新規の劣性抵抗性遺伝子を発見するとともに、それらの作用メカニズムの解明を試みた。

新規劣性抵抗性遺伝子 *EXA1* の発見

ポテックスウイルスである PIAMV は、オオバコ (*Plantago asiatica*) から初めて発見されたことから命名されたが、ユリなどに被害を起こすウイルスとして知られている⁸⁾。はじめに PIAMV-GFP とシロイヌナズナの感染系⁹⁾を用いて、ウイルス感染が抑制される変異体のスクリーニングを行った。その結果、劣性抵抗性を示す変異体 1 系統を特定した。マップベースクローニング法と次世代シーケンサーを用いた SNP の検出により原因遺伝子候補を絞り込み、さらに遺伝学的手法により特定した原因遺伝子は、機能未知遺伝子であり *Essential for potexvirus accumulation 1 (EXA1)* と命名した (図 1)¹⁰⁾。 *exa1* 変異体では、接種葉におけるウイルス感染が顕著に抑制された。 *exa1* 変異体から抽出した葉肉細胞プロトプラストを用いた解析などから、*EXA1* 抵抗性はウイルス感染の初期段階である翻訳あるいは複製の過程を阻害することが示唆された。また、 *exa1* 変異体では PIAMV だけでなく、同じポテックスウイルスである potato virus X (PVX) と alternanthera mosaic virus (AltMV) の接種葉における感染が顕著に抑制された。

興味深いことに、*EXA1* には GYF ドメインと呼ばれる、プロリンリッチ配列に結合することが知られている機能ドメインに加えて、翻訳開始因子である eIF4E との結合モチーフが推定された。また、*EXA1* オルソログは単子葉植物であるイネを含む幅広い植物種にコードされていた。以上のことから、ウイルス感染における *EXA1* の機能は広範な植物種において幅広く共通すること、*EXA1* が既知の劣性抵抗性遺伝子である *eIF4E* と関係することが予想された。実際に、*EXA1* はシロイヌナズナだけでなく、タバコ属植物の *Nicotiana benthaminana* およびトマト (*Solanum lycopersicum*) においても劣性抵抗性遺伝子として機能することが示されている¹¹⁾。

翻訳開始因子遺伝子 *nCBP* による劣性抵抗性の発見

EXA1 に eIF4E 結合モチーフが推定されたことから、ポテックスウイルスに対して翻訳開始因子が劣性抵抗性に関与する可能性があると考え、植物の *eIF4E* ファミリー遺伝子 (*eIF4E*, *eIFiso4E*, *nCBP*) を欠損したシロイヌナズナ変異体に PIAMV を接種した。その結果、*ncbp* 変異体において

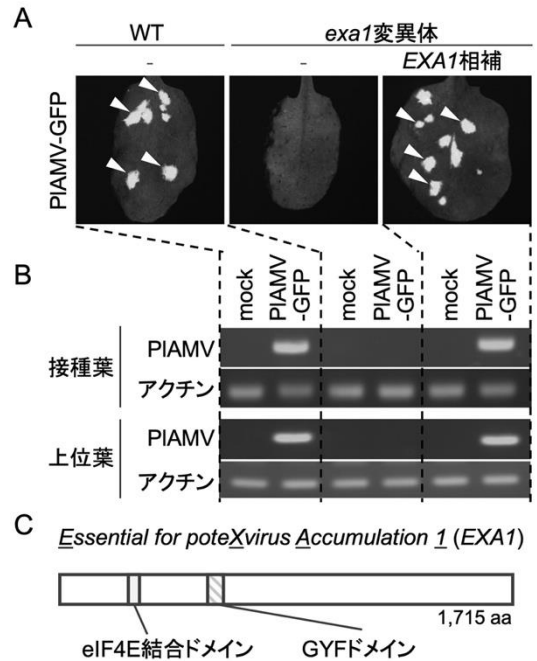


図 1 (A) *EXA1* の変異による PIAMV-GFP 感染への影響。 *exa1* 変異体では PIAMV-GFP の接種葉における感染が阻害された。矢尻はウイルスの感染斑を示す。 WT: 野生型植物。 mock: 非接種。(B) RT-PCR による PIAMV の検出。 *exa1* 変異体では PIAMV-GFP は接種葉と上位葉のいずれにおいても検出されない。(C) *EXA1* に推定された機能ドメイン構造。

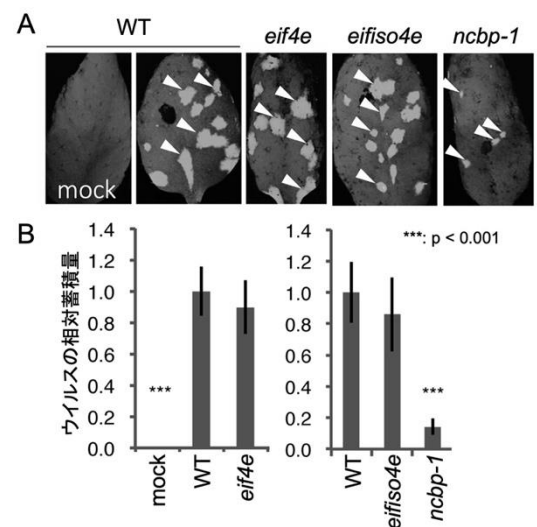


図 2 (A) 植物の *eIF4E* ファミリー遺伝子の変異による PIAMV-GFP 感染への影響。 *ncbp* 変異体では PIAMV-GFP の接種葉における感染が阻害された。矢尻はウイルスの感染斑を示す。 WT: 野生型植物。 mock: 非接種。(B) 定量 PCR による PIAMV の接種葉における相対蓄積量。 *ncbp* 変異体の接種葉において、PIAMV-GFP の蓄積量が低下した。

PIAMV の感染が低下することを見出した (図 2)¹²⁾. *ncbp* 変異体では、葉肉細胞プロトプラストにおける PIAMV の増殖が野生型植物と同程度であり、PIAMV-GFP の接種葉における GFP 蛍光の拡がりや抑制されたことから、細胞間移行が遅れることが示唆された。さらに *ncbp* 変異体では接種葉において移行タンパク質である TGBp2 と TGBp3 の蓄積が低下した。また *nCBP* 抵抗性は、ポテックスウイルスの AltMV および CymMV, 近縁なロラウイルス (lolium latent virus), カルラウイルス (potato virus M) の感染を低下させた。以上のことから, *nCBP* を介した劣性抵抗性はウイルスの移行タンパク質の翻訳を低下させることにより, 感染拡大を遅延させることが示唆された。

これまでの研究により, PIAMV に抵抗性を示すシロイヌナズナ変異体の特定をきっかけにして, 複数のポテックスウイルスの感染を阻害する新規の劣性抵抗性遺伝子として *EXA1* および *nCBP* を見出すとともに, それらのウイルス感染阻害の作用点が異なることが示唆された (図 3)。

おわりに

ポテックスウイルスに対する劣性抵抗性遺伝子として見出された *EXA1* および *nCBP* は, いずれもシロイヌナズナだけでなく様々な植物種においてオルソログ遺伝子が存在する。このことから, ゲノム編集技術を利用してこれらの遺伝子を改変することにより, 様々な作物において劣性抵抗性による非遺伝子組換えのポテックスウイルス抵抗性品種の開発が可能になると期待している。実際に, キャッサバ (*Manihot esculenta*) において *nCBP* 遺伝子をゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 で破壊することにより, ポティウイルスに近縁なイポモウイルスに対して抵抗性になることが報告された¹³⁾。このように植物ウイルスの宿主因子に関する基礎的な研究は, ゲノム編集技術の発展・進化により, ウイルス抵抗性育種への応用の可能性がさらに広がったと言える。一方で, 宿主因子に関する基礎的な研究の大部分は, 環境が制御された実験室内での現象の観察にとどまっているため, 抵抗性育種への応用は一筋縄ではいかない可能性もある。このようなことから, *EXA1* および *nCBP* に限らず植物ウイルスの宿主因子は様々な角度からその機能を明らかにすることが重要である。

謝辞

本賞の受賞にあたり, 一般社団法人日本植物病理学会よりご推薦を賜りました。増田税会長ならびに関係者の皆様にご心より御礼申し上げます。本稿で紹介した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難波成任名誉教授には終始懇切なご指導を賜り, 心より感謝申し上げます。さらに, 山次康幸教授 (東京大学), 煉谷裕太朗助教 (宇都宮大学), 薦田優香准教授 (酪農学園大学), 前島健作准教授 (東京大学), 小松健准教授 (東京農工大学), ならびに東京大学植物病理学研究室および植物医科学研究室に係る諸氏へ, 多大な御助言・御支援をいただき,

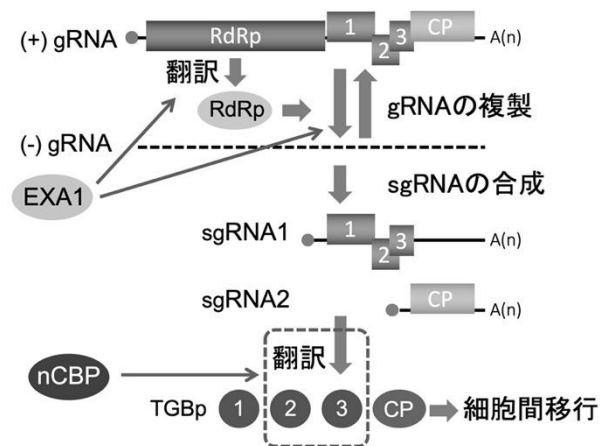


図 3 ポテックスウイルスの増殖過程と, 本研究で発見した *EXA1* および *nCBP* を介した劣性抵抗性によるポテックスウイルスの感染阻害モデル. 2種類の劣性抵抗性は異なる感染阻害の作用点を持ち, *EXA1* を介した劣性抵抗性はウイルスの翻訳もしくは複製を, *nCBP* を介した劣性抵抗性は移行タンパク質である TGBp2 および TGBp3 の翻訳を低下させる。

深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Tsuda S., Sano T. 2014. Threats to Japanese agriculture from newly emerged plant viruses and viroids. *J Gen Plant Pathol* 80: 2-14.
- 2) Maejima K, Hoshi H, Hashimoto M, Himeno M, Kawanishi T, Komatsu K, Yamaji Y., Hamamoto H, Namba S. 2010. First report of plum pox virus infecting Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) in Japan. *J Gen Plant Pathol* 76:229-231.
- 3) Kang BC, Yeam I., Jahn MM. 2005. Genetics of Plant Virus Resistance. *Annu Rev Phytopathol* 43: 581-621.
- 4) Hyodo K, Tetsuro Okuno T. 2014. Host factors used by positive-strand RNA plant viruses for genome replication. *J Gen Plant Pathol* 80: 123-135.
- 5) Hashimoto M, Maejima K, Yamaji Y, Namba S. 2021. Plant resistance to viruses: natural resistance associated with recessive genes. In: Bamford D, Zuckerman M (ed) *Encyclopedia of Virology 4th Edition*, pp 69-80, Elsevier.
- 6) Hashimoto M., Neriya Y., Yamaji Y., Namba S. 2016. Recessive Resistance to Plant Viruses: Potential Resistance Genes Beyond Translation Initiation Factors. *Front Microbiol* 7: 1695.
- 7) Verchot J. 2022. Potato virus X: A global potato-infecting virus and type member of the Potexvirus genus. *Mol Plant Pathol* 23: 315-320.
- 8) Komatsu K, Hammond J. 2022. Plantago asiatica mosaic virus: An emerging plant virus causing necrosis in lilies and a new model RNA virus for molecular research. *Mol Plant Pathol* 23: 1401-1414.
- 9) Minato N., Komatsu K., Okano Y., Maejima K., Ozeki J., Senshu H., Takahashi S., Yamaji Y., Namba S. 2014. Efficient foreign gene expression in planta using a plantago asiatica mosaic virus-based vector achieved by the strong RNA-silencing suppressor activity of TGBp1. *Arch Virol* 159: 885-896.
- 10) Hashimoto M, Neriya Y, Keima T, Iwabuchi N, Koinuma H, Hagiwara-Komoda Y, Ishikawa K, Himeno M, Maejima K, Yamaji Y, Namba S. 2016. EXA1, a GYF domain protein, is responsible for loss-of-susceptibility to plantago asiatica mosaic virus in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 88: 120-131.
- 11) Yusa A, Neriya Y, Hashimoto M, Yoshida T, Fujimoto Y, Hosoe N, Keima T, Tokumaru K, Maejima K, Netsu O, Yamaji Y, Namba S. 2019. Functional conservation of EXA1 among diverse plant species for the infection by a family of plant viruses. *Sci Rep* 2019 9: 5958.
- 12) Keima T, Hagiwara-Komoda Y, Hashimoto M, Neriya Y, Koinuma H, Iwabuchi N, Nishida S, Yamaji Y, Namba S. 2017. Deficiency of the eIF4E isoform nCBP limits the cell-to-cell movement of a plant virus encoding triple-gene-block proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Rep* 7:39678.
- 13) Gomez MA, Lin ZD, Moll T, Chauhan RD, Hayden L, Renninger K, Beyene G, Taylor NJ, Carrington JC, Staskawicz BJ, Bart RS. 2019. Simultaneous CRISPR/Cas9-mediated editing of cassava eIF4E isoforms nCBP-1 and nCBP-2 reduces cassava brown streak disease symptom severity and incidence. *Plant Biotechnol J* 17: 421-434.