

ウイルス感染時に働く植物免疫抑制因子とその作用機作の解明

岡野 夕香里 (福島大学食農学類)

okano@agri.fukushima-u.ac.jp

はじめに

昨今、世界人口の増加に伴い、食糧不足は深刻化しつつあり、農作物の生産効率の向上は喫緊の課題となっている。植物病原微生物は植物病の主要因であり、農作物の収量減少や品質低下を引き起こしている。植物病原微生物には、糸状菌、細菌、植物ウイルスなどが含まれ、中でも植物の代謝系に依存して増殖する植物ウイルスは防除が困難である。植物ウイルス病の特効薬はいまだに開発されておらず、抵抗性品種の利用など、植物が備えている免疫機構を利用した防除法が現在のところ最も有効である。この防除法をより有効に展開するためには、ウイルスと植物の免疫機構の間に働く分子メカニズムを詳細に明らかにすることが重要である。

RNA サイレンシング抑制メカニズムに関する研究

RNA サイレンシングは、真核生物に保存された配列特異的な遺伝子発現調節機構である。この機構は、植物においてはウイルス免疫機構としても機能し、植物細胞内に侵入したウイルスのゲノムに由来する 2 本鎖 RNA を認識することにより発動し、ウイルス RNA を配列特異的に分解する¹⁾。一方、ウイルスの方はこれに対抗し、RNA サイレンシングを抑制するタンパク質因子「RNA サイレンシングサプレッサー (以下、サプレッサー)」を獲得している。我々は、農作物に被害をもたらすウイルス種を多く含む、ポテックスウイルス属を対象に研究を行った。ポテックスウイルス属では、ウイルスが植物体内で感染細胞から隣接細胞に移行する際に働くウイルスタンパク質の一つである、TGBp1 がサプレッサーであることが知られているが²⁾、その詳細な機能メカニズムは不明であった。そこで、ユリなどの花卉に被害をもたらすポテックスウイルス属の一種である *plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) をモデルに、そのサプレッサー TGBp1³⁾ の RNA サイレンシング抑制メカニズムの解明を試みた⁴⁾。まず、TGBp1 をシロイヌナズナに形質転換し、その形態を観察したところ、ロゼット葉が下側に巻く表現型が見られた (図 1)。この表現型は、シロイヌナズナの遺伝子発現調節のための RNA サイレンシング経路の 1 つである、trans-acting small interfering RNA (tasiRNA) 経路に關与する遺伝子の欠損変異体の表現型と酷似していた。このことから、TGBp1 は tasiRNA 経路のいずれかの過程を阻害していると考えられた。そこで、TGBp1 形質転換体を用いて tasiRNA 経路中で生成される、tasiRNA など様々な RNA 種の蓄積量を解析した。その結果、TGBp1 は RNA サイレンシング経路中の、「2 本鎖 RNA 合成」という段階を阻害することが明らかとなった。次に、この 2 本鎖 RNA 合成を担う植物タンパク質である RDR6 および SGS3 に TGBp1 が与える影響について解析を行った。RDR6 および SGS3 による 2 本鎖

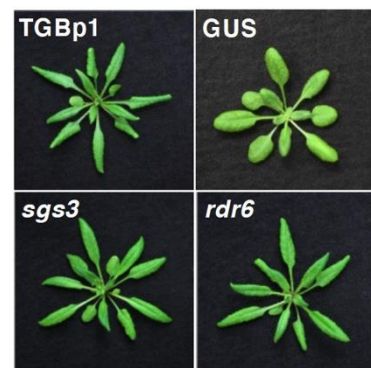


図 1. TGBp1 形質転換シロイヌナズナの表現型

sgs3, *rdr6* は tasiRNA 経路関連遺伝子の変異体、GUS はネガティブコントロール

RNA 合成は、ウイルス免疫機構としての RNA サイレンシング経路においても、サイレンシング反応の増幅を担っており、重要な役割を果たしている⁵⁾。タバコ属植物 *Nicotiana bentamiana* において、TGBp1 と RDR6 または SGS3 を共発現し、共免疫沈降実験を行った結果、TGBp1 と RDR6 および SGS3 が相互作用していることが明らかとなった。さらに、TGBp1 と SGS3 に蛍光タンパク質 (それぞれ YFP と CFP) をマーカーとして付加し、*N. bentamiana* の葉で発現し、表皮細胞内におけるそれぞれのタンパク質の細胞内局在を解析した。その結果、SGS3 は単独発現時には、細胞質に点在する顆粒状構造である SGS3/RDR6 body⁶⁾ に局在していた (図 2A)。また、TGBp1 は単独発現時には、核、細胞質、原形質連絡に局在していた (図 2B)。次に、SGS3 と TGBp1 を共発現したところ、SGS3 が局在している SGS3/RDR6 body が、細胞質内の一か所に寄り集まっている様子が観察された。また、TGBp1 はその SGS3/RDR6 body の集合している部分の周囲を取り囲むように存在しており、凝集体を形成していた (図 2C, D)。TGBp1 はホモオリゴマーを形成することから⁷⁾、TGBp1 のアミノ酸置換変異体を作成し、サイレンシング抑制能と TGBp1 同士のオリゴマー形成能を解析し、それぞれの関係性を解析した。その結果、RNA サイレンシングの抑制には、TGBp1 同士のオリゴマー形成能が関与することが明らかとなった。以上から、TGBp1 は SGS3/RDR6 body 内の RDR6 と SGS3 と結合し、ホモオリゴマー形成能を利用して互いに引き合い、細胞質において SGS3/RDR6 body を包みこむように凝集体を形成し、2 本鎖 RNA 合成を阻害することで、ウイルス免疫機構としての RNA サイレンシングを抑制していると考えられた (図 3)。

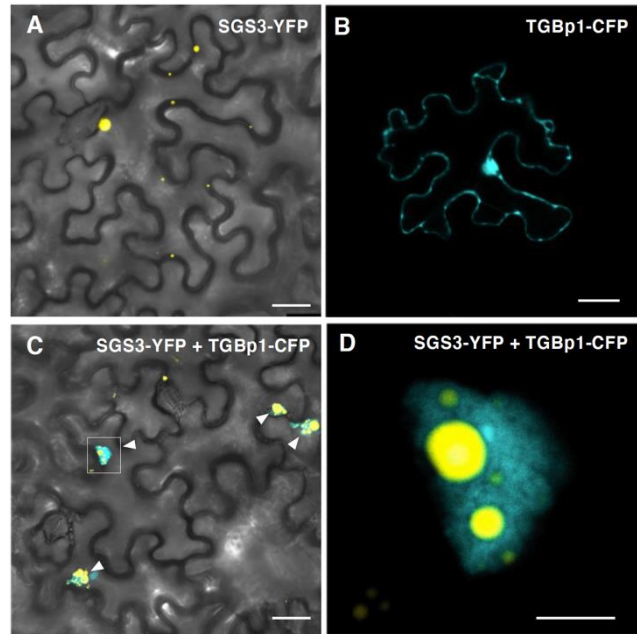


図 2 SGS3 と TGBp1 の細胞内局在

A, B は SGS3 と TGBp1 をそれぞれ単独発現させた際の局在。C, D は SGS3 と TGBp1 を共発現させた際の局在。C の矢頭は形成された凝集体を示す。スケールバーは A, B, C は 25 μm 、D は 5 μm 。

SGS3/RDR6 body

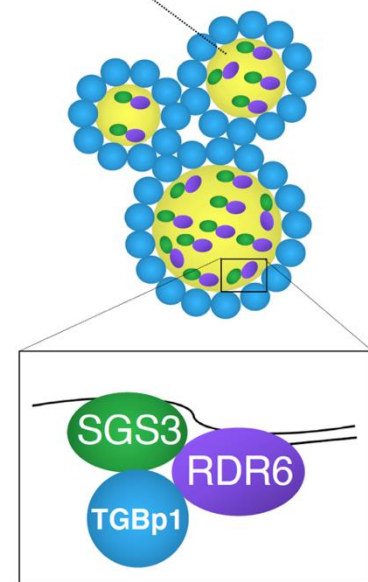


図 3 TGBp1 による RNA サイレンシング抑制モデル

新規なウイルス抵抗性遺伝子 *JAX1* の発見と実用化に向けた研究

植物ウイルスに対するもう一つの免疫機構である優性抵抗性遺伝子の探索を行った。緑色蛍光タンパク質 (GFP) をゲノム内に導入した GFP 発現 PIAMV ベクターを用いて、多数のシロイヌナズナのエコタイプに接種を行い、GFP 蛍光を観察することで、ウイルス抵抗性のエコタイプをスクリーニングした。その結果、PIAMV の全身移行を阻害するエコタイプ Bay-0 を選抜した。

交配実験の結果、この Bay-0 が有する抵抗性は、単一優性（顕性）の遺伝子に依存していることが分かった。次に、ポジショナルクローニングを行ったところ、ジャカリンレクチンドメインを有する 131 アミノ酸のタンパク質が抵抗性タンパク質として同定され、これを JAX1 と名付けた⁸⁾。続いて、この抵抗性の作用機作について解析したところ、JAX1 はウイルスの複製酵素と相互作用し、ウイルスの複製を阻害することが明らかとなった⁹⁾。これまで、長年研究されてきている NB-LRR 型の抵抗性遺伝子（*R* 遺伝子）は、単離した元の植物の科から異なる科の植物に遺伝子組み換えによって移動させると、抵抗性を発揮できなかつたり、生育異常を引き起こしたりする¹⁰⁾。これは、NB-LRR 型の *R* 遺伝子による抵抗性の発揮のメカニズムと関連している。NB-LRR 型の *R* 遺伝子は病原体の特定のタンパク質を認識しており、認識シグナルを下流の因子に伝達することで、抵抗性を発現している。植物の科を越えると、この下流因子の保存性が低いために、*R* 遺伝子のみを移動しても、シグナルの伝達がうまく行かず抵抗性が発揮されなかつたり、生育に有害な反応が起こるものと考えられる。JAX1 の場合、下流の因子は必要でなく、ウイルスの複製酵素に直接作用し、ウイルス複製を阻害するため、NB-LRR 型の *R* 遺伝子とは異なり、科を越えて抵抗性を発現するものと考えられる。

そこで JAX1 遺伝子をカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターの直下につないでトマト（ナス科）に形質転換して、自家交配を繰り返し、ホモライン（35S-FLAG-JAX1）を得た¹¹⁾。JAX1 遺伝子の mRNA およびタンパク質の発現をそれぞれ RT-PCR およびウエスタンブロットで解析したところ、35S-FLAG-JAX1 では、JAX1 が恒常的にかつ安定的に発現していることが確認された。また、形態の観察を行ったところ、生育異常は全く見られなかつた。この 35S-FLAG-JAX1 に対して、世界中でトマトに被害をもたらしているポテックスウイルス種のひとつ pepino mosaic virus (PepMV) に対する抵抗性について検定した。PepMV は種内の遺伝的多様性が高く、3 つの genotype group に分けられる¹²⁾。この 3 つの genotype group から 12 分離株を選び、接種試験を行った。その結果、野生型のトマトはいずれの分離株にも 100%感染したが、35S-FLAG-JAX1 はいずれの分離株にも全く感染しなかつた。従って、JAX1 はトマトで PepMV に対して広範な抵抗性を発揮することが示され、JAX1 遺伝子は単離元のシロイヌナズナ（アブラナ科）からトマト（ナス科）に遺伝子組み換えにより移動しても、強い抵抗性を発揮できることが明らかとなった。

おわりに

本研究により、RNA サイレンシングと JAX1 による優性抵抗性という、ポテックスウイルスに対する 2 種類の抵抗性とポテックスウイルスとの相互作用を明らかとし、ウイルス抵抗性品種の開発につながる知見を得た。これらの知見を生かし、PIAMV の TGBp1 配列に対する RNA サイレンシングを強力に誘導するヘアピン配列や JAX1 遺伝子を植物に導入したりすることにより、PIAMV に対する強固な抵抗性を有する品種の開発が可能であると考えられる。また、JAX1 はポテックスウイルス属に対して広範な抵抗性を発揮するため^{8,11)}、同様の方法により様々な植物においてウイルス抵抗性品種の作出が期待される。

謝辞

本賞を受賞するにあたり、日本植物病理学会よりご推薦を頂きました。増田税会長ならびに学会関係者の皆様に厚く御礼を申し上げます。本研究を遂行するにあたり、東京大学の難波成任名誉教授、山次康幸教授、前島健作准教授、東京農工大学農学研究院の小松健准教授、農業・食品

産業技術総合研究機構の吉田哲也博士をはじめ、東京大学植物病理学研究室、東京大学植物医科学研究室、農業・食品産業技術総合研究機構生物機能利用研究部門の方々から多くのご指導・ご協力を賜りました。心より感謝申し上げます。

引用文献

1. Ding SW, Voinnet O. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*. 2007; 130(3):413–26.
2. Voinnet O, Lederer C, Baulcombe DC. A Viral Movement Protein Prevents Spread of the Gene Silencing Signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell*. 2000; 103(1):157-67.
3. Senshu H, Ozeki J, Komatsu K, Hashimoto M, Hatada K, Aoyama M, Kagiwada S, Yamaji Y, Namba S. Variability in the level of RNA silencing suppression caused by triple gene block protein 1 (TGBp1) from various potexviruses during infection. *J Gen Virol*. 2009; 90:1014–24.
4. Okano Y, Senshu H, Hashimoto M, Neriya Y, Netsu O, Minato N, Yoshida T, Maejima K, Oshima K, Komatsu K, Yamaji Y, Namba S. In planta recognition of a double-stranded RNA synthesis protein complex by a potexviral RNA silencing suppressor. *Plant Cell*. 2014; 26(5):2168-2183.
5. Wang XB, Jovel J, Udornporn P, Wang Y, Wu Q, Li WX, Gascioli V, Vaucheret H, Ding SW. The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative argonautes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 2011; 23(4):1625–38.
6. Kumakura N, Takeda A, Fujioka Y, Motose H, Takano R, Watanabe Y. SGS3 and RDR6 interact and colocalize in cytoplasmic SGS3/RDR6-bodies. *FEBS Lett*. 2009; 583(8):1261–6.
7. Leshchiner AD, Minina EA, Rakitina DV, Vishnichenko VK, Solovyev AG, Morozov SY, Kalinina NO. Oligomerization of the potato virus X 25-kD movement protein. *Biochemistry (Mosc.)* 2008; 73: 50–55.
8. Yamaji Y, Maejima K, Komatsu K, Shiraishi T, Okano Y, Himeno M, Sugawara K, Neriya Y, Minato N, Miura C, Hashimoto M, Namba S. Lectin-mediated resistance impairs plant virus infection at the cellular level. *Plant Cell*. 2012; 24(2):778-793.
9. Yoshida T, Shiraishi T, Hagiwara-Komoda Y, Komatsu K, Maejima K, Okano Y, Fujimoto Y, Yusa A, Yamaji Y, Namba S. The Plant Noncanonical Antiviral Resistance Protein JAX1 Inhibits Potexviral Replication by Targeting the Viral RNA-Dependent RNA Polymerase. *J Virol*. 2019; 93:e01506-18.
10. Joshi RK, Nayak S. Functional characterization and signal transduction ability of nucleotide-binding site-leucine-rich repeat resistance genes in plants. *Genet Mol Res*. 2011; 10:2637-52.
11. Okano Y, Maejima K, Yoshida T, Nishida S, Tokuda R, Nishikawa M, Namba S, Yamaji Y. Interfamily transfer of *Arabidopsis* lectin-mediated antiviral gene confers resistance to pepino mosaic virus in tomato. *J Gen Plant Pathol*. 2020; 86(4):274-282.
12. Alfaro-Fernández A, Sánchez-Navarro JÁ, Cebrián M del C, Córdoba-Sellés M del C, Pallás V, Jordá C. Simultaneous detection and identification of Pepino mosaic virus (PepMV) isolates by multiplex one-step RT-PCR. *Eur J Plant Pathol*. 2009; 125(1):143–58.