学会賞受賞者講演

植物ウイルスの病原性変異機構に関する研究[†]

桑田 茂*

KUWATA, S.*: Studies on the mechanisms of pathogenic changes of plant viruses

自然界における植物ウイルス病の病徴は極めて変化に富み、病徴の多様性は、病原ウイルスの種類やその系統と宿主植物の組み合わせによってもたらされる。そのため、植物ウイルスの病原性とその変異機構の理解は植物と植物ウイルスの相互作用

の解明には必須であり、植物病理学の重要な課題の一つである。私はこれまで約 40 年間にわたり、数種類の植物ウイルスの研究を行ってきた。その過程で植物ウイルスの中には同じウイルス種に分類されるにもかかわらず、同一の宿主植物に大きな病原性の差異を示すことから、系統として分けられるものが多いことに興味を持ち、その病原性の変異に関する研究を行ってきた。

植物ウイルスのゲノムと病原性の関連に関する研究は古くから行われてきた。その最初の例として、植物ウイルスの人為的変異株を取得するためタバコモザイクウイルス (TMV) RNA の亜硝酸処理によりタバコにおける病徴が変化した TMV を分離した研究 (Gierer and Mundry, 1958) が挙げられる。その後、Tsugita and Fraenkel-Conrat (1960) は亜硝酸処理によって病徴が軽微になった TMV 変異株の外被タンパク質の C 末端領域にアミノ酸置換がみられることを報告している。これらの実験から、病徴がゲノム RNA の塩基置換やウイルスタンパク質のアミノ酸変異によりもたらされることが示唆された。しかしながら、RNA ウイルスの病原性変異とウイルスゲノム RNA の塩基配列の変化との直接的な関係性を証明するには当時の分子生物学手法では限界があった。植物ウイルスの大部分を占めるプラス鎖 1 本鎖 RNA ウイルスでは、転写ベクター pPM1 を用いて Brome mosaic virus の完全長 cDNA クローンから感染性

RNA を試験管内で作製することに成功し、植物ウイルスの分子生物学研究の大きなブレークスルーとなった (Ahlquist and Janda, 1984; Ahlquist *et al.*, 1984)。その後、TMV などの主要な植物ウイルスについて次々と試験管内感染性 RNA 転写系が構築されて、逆遺伝学的手法を用いたウイルスゲノムの遺伝子解析や機能解析が飛躍的に進んだ。

以下に、これまで私が行った研究の中からキュウリモザイクウイルス (CMV) とタバコ条斑ウイルス (TSV) について研究概要を紹介します。

1. 試験管内感染性 RNA 転写ベクターと CMV サテライト RNA

我々の研究室では、Ahlquist and Janda (1984) が用いた λ PR プロモータ由来の pPM1 ではなく、一般的で操作がより容易な T7RNA プロモータを利用して転写開始点直下流にクローン化した cDNA を 5' 末端から正確に転写可能なベクター pUT118 と pUT118GG を作製し、生物活性を有するキュウリモザイクウイルス (CMV) のサテライト RNA を転写する系を構築した (Kuwata *et al.*, 1988)。この系を CMV や CMV サテライト RNA の分子生物学的研究に利用した (Masuta, 2014)。CMV からは多数のサテライト RNA が分離されており、CMV 病徴を軽減するサテライトから、その逆に病徴を激しくするもの、病徴に影響しないものまで多種多様である。CMV サテライト RNA の中でも黄化病徴誘導能という特異な性質をもつ Y サテライト RNA (Takanami, 1981) は病徴とサテライト RNA の関連を解明するために世界の多くのグループで研究され、Y サテライト RNA の黄化病徴誘導能に関連する塩基配列領域が特定された (Devic *et al.*, 1989; Jaegle *et al.*, 1990)。我々は、黄化病徴誘導能をもつ Y サテライト RNA と塩基配列の相関性が高いが誘導能を

[†] 平成 30 年 3 月 25 日 平成 30 年度大会で行われた学会賞受賞者講演の要旨の和文版

* 明治大学農学部 School of Agriculture, Meiji University, Kawasaki 214-8571, Japan

もたない S19 サテライト RNA を材料としてキメラ体を作製して黄化病徴誘導部位を特定した。また、黄化病徴誘導部位に部位特異的変異を導入する実験から Y サテライト RNA の 5' 末端から 191 から 193 番目に存在する 3 塩基 (AUU) が黄化誘導を決定しており、黄化病徴誘導能をもたない S19 サテライト RNA の対応する部位 (-GC) にこの配列を導入すると黄色病徴誘導能が付与できることを明らかにした (Kuwata *et al.*, 1991)。Y サテライト RNA の黄化病徴誘導能の機作は、最終的に Y サテライト RNA の黄化誘導領域に対する siRNA が塩基配列相同性のあるクロロフィル生合成酵素の 1 つである magnesium protoporphyrin chelatase subunit I 遺伝子 (*ChlI*) の mRNA を RNA サイレンシング (RS) により分解することが明らかとなっている (Shimura *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2011)。

2. CMV 病徴を決定する因子

CMV では指標植物に対する病原性の差異から多数の系統が分離されてきた。日本国内ではタバコにおいて普通系統 (CMV-O) や黄斑系統 (CMV-Y) など数系統の発生が報告されている。CMV 遺伝子の機能解析を進めるため、CMV-Y の全ゲノムの塩基配列 (Nitta *et al.*, 1988; Kataoka *et al.*, 1990a; Kataoka *et al.*, 1990b) を決定するとともに、その際に使用した部分長クローンを連結して転写ベクター pUT118 と pUT118GG に挿入することで、試験管内感染性 RNA 転写系を構築した。また、RNA3 の部分的欠損クローンをを用いた解析から、3a 遺伝子が細胞間移行に必須であり、外被タンパク質 (CP) の部分的欠損により RNA 保護の能力を失うと細胞間移行能も失うことを明らかにした (Suzuki *et al.*, 1991)。Shintaku (1991) は CMV の 4 種類の緑色モザイク系統と 4 種類の黄色モザイク系統の CP のアミノ酸配列のアラインメントから、129 番のアミノ酸の種類が CMV の緑色モザイクと黄色モザイクの病徴の決定因子と推定した。その後、緑色モザイクの Fny 系統と黄色モザイクの M 系統の CP 遺伝子間のキメラ体や部位特異的変異の導入により、M 系統 CP の 129 番のアミノ酸をロイシンからプロリンに変えると緑色モザイク、Fny 系統のプロリンをセリンに変えると黄色モザイクとなることを明らかにした (Shintaku *et al.*, 1992)。我々は緑色モザイクの CMV-O と黄色モザイクの CMV-Y の CP 間のキメラ体の解析から 129 番のアミノ酸がプロリンの場合は緑色、セリンの場合は黄色モザイクとなることを明らかにすることができた。興味深いことに CP の 129 番目のアミノ酸をプロリンやセリン以外のアミノ酸とする実験からフェニルアラニンでは激しい壊死を生ずることを示すことができた (Suzuki *et al.*, 1995)。変異導入 RNA3

を RNA1, 2 とともにプロトプラストに接種して蛍光抗体で CP を検出したところ、壊死が誘導されるフェニルアラニンやロイシンでは CP は凝集して観察され、電子顕微鏡で粒子がほとんど検出されないことから、129 番のアミノ酸の種類により CP が正常な高次構造を取ることができなくなったものと考えられる。129 番目のアミノ酸は CP の β E- α EF ループ内にあると推定されており、ウイルス粒子では表面に位置している (Wikoff *et al.*, 1997)。CMV-Y の CP では 129 番をロイシンに変えるとタバコに壊死を誘導するが、CMV-M では 129 番がロイシンで黄色モザイクを示すことから 129 番のアミノ酸の種類だけで病徴が決定されているのではなく、CP の 129 番目以外の部位との相互作用が病徴誘導に関与していると推察される。現在では、CP の 129 番目のアミノ酸は全 20 種類について変異を入れた実験が行われており、病徴とチラコイド膜の量との関連が示されている (Mochizuki and Ohki, 2011)。最近、黄色モザイク病徴を誘導する CMV-M の CP がフェレドキシン I と酵母ツーハイブリッド系で結合すること示され、さらに二分子蛍光補完法で生体内でも結合性があることから CMV-M の CP により葉緑体内に輸送されるフェレドキシン I が減少することで活性酸素により葉緑体が損傷するとの報告がある (Qiu *et al.*, 2018)。CMV の病徴を決定しているのは CP だけではなく、これまでに 1a, 2a, 2b, 3a タンパク質のアミノ酸変異によって病原性が変化することが報告されており、それらに関する総説もある (Palukaitis and García-Arenal, 2003; Mochizuki and Ohki, 2012; Jacquemond, 2012)。

3. タバコ条斑ウイルス (TSV) の病原性変異と RNA サイレンシング抑制能

TSV はイタリウイルス属の基準種であり、ククモウイルス属の CMV と同じ 3 分節のプラス鎖 1 本鎖 RNA ウイルスのプロモウイルス科に分類される。プロモウイルス科のアルファモウイルス属のアルファモザイクウイルス (AMV) とイタリウイルス属の TSV はゲノム RNA だけでは感染性がなく、ゲノム RNA に CP もしくは RNA4 を加えないと感染性を示さないという特徴から両者はプロモウイルス科の中では近縁であると考えられている。その理由は宿主細胞内でのゲノム RNA の翻訳過程で CP がゲノム RNA の翻訳開始に重要な役割を担っているためである (Bol, 2005)。TSVRNA2 には、RNA サイレンシングサプレッサー (RSS) である CMV2b タンパク質と塩基配列やアミノ酸配列には相同性が認められない機能不明の TSV2b タンパク質がコードされている。TSV のタバコにおける病徴は接種葉に壊死斑を生じて、その 2 ないし 3 枚の上位葉では激しい

壊死と黄化が見られるが、その後に展開する新出葉では無病徴となりウイルス病徴の回復することが知られ、タバコ品種によっては葉縁部が鋸歯状となる特徴をもち、TSVの無病徴回復葉ではウイルス量は病徴を示す感染葉と同程度であるという特徴がある (Scott, 2001). 一般に、植物ウイルスの病徴回復現象については植物側の局所のおよび全身的RSによりウイルスの増殖が妨げられて上位葉でのウイルス量が低下することに起因すると考えられており (Pennazio *et al.*, 1999; Ghoshal and Sanfaçon, 2015), 強いRSSをもつウイルスではウイルス量が低下せず、病徴回復現象は起こらないと考えられる. そこで、機能不明の2b遺伝子をもつTSVのRSS能を検討するため、日本で分離されたTSV (Tomaru *et al.*, 1985) からすべてのORF (1a, 2a, 2b, 3a, CP) を単離してバイナリーベクターに組込んで、それぞれをアグロインフィルトレーション法で発現し、緑色蛍光タンパク質 (GFP) に対する局所的RSS能を調べたが、どのORFを発現しても局所的RSS能は認められなかった. そこで、GFP発現ペンタミアナタバコにGFPの逆位反復配列を発現するコンストラクトをアグロインフィルトレーション法で注入してGFPに対する全身的RS誘導個体を作製してTSVを接種したところ、TSV全身感染葉ではGFP蛍光が回復したことから、TSVはRSS能を有することが明らかになった. CP, 2b, 3a遺伝子をジャガイモXウイルス (PVX) ベクターにそれぞれクローン化して、同様にGFP全身的RNAサイレンシング個体に接種したところ、TSVと同様にCP発現PVXベクターを接種した個体のみがGFP蛍光が回復したことから、CPに全身的RSS能があることが判明した. TSVウイルス粒子から高濃度塩化カルシウム処理により単離したCPや大腸菌発現により作製した変異CPと合成2本鎖siRNAとの結合実験を行ったところ、CPのN末端近傍に存在するジnkフingガードメインではなくRNA結合ドメインに2本鎖RNA結合能をもつことが示され、TSVCPの2本鎖RNA結合能がTSVの全身的RSS能の本体であると考えられた. TSVの全身感染葉での無病徴回復葉出現の現象については、回復能が失われた変異TSV株ではRNA3の移行タンパク質コード領域と外被タンパク質コード領域間の遺伝子間領域 (intergenic region) 内の1塩基の変異が原因となりCP蓄積量やゲノムRNA量の減少していることが報告されており、CPの蓄積量が減少することとRSS能の関連が指摘されている (Xin and Ding, 2003). 病徴回復能を失ったTSVではRSS能をもつCPの減少によりウイルス量が減少するが、逆に病徴が激しくなるという通常のウイルスRSSとは異なる影響を病徴に与える点が興味深い. また、全身的RSS能をもつTSVが感染することでダリアの黒色品

種の*flavone synthase II*のRSを抑制して、花色を紫色に変化させることが報告されている (Deguchi *et al.*, 2015). TSVと同じイラルウイルス属ではあるがサブグループが異なるアスパラガスウイルスII (AV-2) では2b遺伝子が全身的RSSとして機能することが報告されている (Shimura *et al.*, 2013).

おわりに

これまで、CMVとTSVの病徴を決定づける遺伝子について研究を行い、いくつかの知見を得ることができた. 急速に進んでいる植物の遺伝子解析の知見と植物ウイルス遺伝子機能解析の成果を結びつけることで、植物ウイルスの病原性の理解が今後さらに深まってゆくことを期待する.

謝辞：これまで植物病理学の研究者として私が歩んで来ることができたのは、東京大学植物病理学教室で故奥良清先生、故土居養二先生、故山下修一先生からご指導を賜ったおかげであり、ここに深く感謝いたします. また、日本専売公社 (現日本タバコ株式会社) の研究機関で故都丸啓一先生、久保進博士、故高浪洋一先生、増田税先生、鈴木匡先生などの方々からご指導ならびに共同研究をしていたいただいたことに御礼申し上げます. 明治大学では米山勝美先生、大里修一先生からご指導や有益な助言をいただいたことに深く感謝いたします. また、明治大学植物細胞工学研究室で研究に取り組んでくれた学生諸君の努力に対してここに敬意を表します.

引用文献

- Ahlquist, P., French, R., Janda, M. and Loesch-Fries, L.S. (1984). Multicomponent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 81: 7066–7070.
- Ahlquist, P. and Janda, M. (1984). cDNA cloning and in vitro transcription of the complete brome mosaic virus genome. *Mol. Cell. Biol.* 4: 2876–2882.
- Bol, J.F. (2005). Replication of Alfamov- and Ilarviruses: role of the coat protein. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 39–62.
- Deguchi, A., Tatzawa, F., Hosokawa, M., Doi, M. and Ohno, S. (2015). Tobacco streak virus (strain dahlia) suppresses post-transcriptional gene silencing of flavone synthase II in black dahlia cultivars and causes a drastic flower color change. *Planta* 242: 663–675.
- Devic, M., Jaegle, M. and Baulcombe, D. (1989). Symptom production on tobacco and tomato is determined by two distinct domains of the satellite RNA of cucumber mosaic virus (strain Y). *J. Gen. Virol.* 70: 2765–2774.
- Ghoshal, B. and Sanfaçon, H. (2015). Symptom recovery in virus-infected plants: Revisiting the role of RNA silencing mechanisms. *Virology* 479–480: 167–179.

- Gierer, A. and Mundry, K.W. (1958). Production of mutants of tobacco mosaic virus by chemical alteration of its ribonucleic acid in vitro. *Nature* 182: 1457–1458.
- Jaegle, M., Devic, M., Longstaff, M. and Baulcombe, D. (1990). Cucumber mosaic satellite RNA (Y strain): analysis of sequences which affect yellow mosaic symptoms on tobacco. *J. Gen. Virol.* 71: 1905–1912.
- Jacquemond, M. (2012). Cucumber mosaic virus. *Adv. Virus. Res.* 84: 439–504.
- Kataoka, J., Masuta, C. and Takanami, Y. (1990a). Complete nucleotide sequence of RNA2 of cucumber mosaic virus Y strain. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 56: 495–500.
- Kataoka, J., Masuta, C. and Takanami, Y. (1990b). Complete nucleotide sequence of RNA1 of cucumber mosaic virus Y strain and evolutionary relationships among genome RNAs of the virus strains. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 56: 501–507.
- Kuwata, S., Masuta, C. and Takanami, Y. (1988). Construction of novel transcription vectors for production of biologically active transcripts from viral cDNAs. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 54: 510–515.
- Kuwata, S., Masuta, C. and Takanami, Y. (1991). Reciprocal phenotype alterations between two satellite RNAs of cucumber mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 72: 2385–2389.
- Masuta, C. (2014). Molecular biology of cucumber mosaic virus and its satellite RNA. *J. Gen. Plant Pathol.* 80: 514–518.
- Mochizuki, T. and Ohki, S.T. (2011). Single amino acid substitutions at residue 129 in the coat protein of Cucumber mosaic virus affect symptom expression and thylakoid structure. *Arch. Virol.* 156: 881–886.
- Mochizuki, T. and Ohki, S.T. (2012). Cucumber mosaic virus: viral genes as virulence determinants. *Mol. Plant Pathol.* 13: 217–225.
- Nitta, N., Masuta, C., Kuwata, S. and Takanami, Y. (1988). Comparative studies on the nucleotide sequence of cucumber mosaic virus RNA3 between Y strain and Q strain. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 54: 516–522.
- Palukaitis, P. and García-Arenal, F. (2003). Cucumoviruses. *Adv. Virus Res.* 62: 241–323.
- Pennazio, S., Roggero, P. and Conti, M. (1999). Recovery of plants from viral diseases: historical and new perspectives. *J. Plant Dis. Pro.* 106: 128–139.
- Qiu, Y., Zhang, Y., Wang, C., Lei, R., Wu, Y., Li, X. and Zhu, S. (2018). Cucumber mosaic virus coat protein induces the development of chlorotic symptoms through interacting with the chloroplast ferredoxin I protein. *Sci. Rep.* 8: 1205 doi: 10.1038/s41598-018-19525-5.
- Scott, S.W. (2001). Tobacco streak virus. CMI/A.A.B. Descriptions of Plant Viruses No. 381.
- Shimura, H., Pantaleo, V., Ishihara, H., Myojo, N., Inaba, J., Sueda, K., Burguán, J. and Masuta, C. (2011). A viral satellite RNA induces yellow symptoms on tobacco by targeting a gene involved in chlorophyll biosynthesis using the RNA silencing machinery. *PLoS Pathog.* 7: e1002021.
- Shimura, H., Masuta, C., Yoshida, N., Sueda, K. and Suzuki, M. (2013). The 2b protein of Asparagus virus 2 functions as an RNA silencing suppressor against systemic silencing to prove functional synteny with related cucumoviruses. *Virology* 442: 180–188.
- Shintaku, M. (1991). Coat protein gene sequences of two cucumber mosaic virus strains reveal a single amino acid change correlating with chlorosis induction. *J. Gen. Virol.* 72: 2587–2589.
- Shintaku, M.H., Zhang, L. and Palukaitis, P. (1992). A single amino acid substitution in the coat protein of cucumber mosaic virus induces chlorosis in tobacco. *Plant Cell* 4: 751–757.
- Smith, N.A., Eamens, A.L. and Wang, M.-B. (2011) Viral small satellite interfering RNAs target host genes to mediate disease symptoms in plants. *PLoS Pathog.* 7: e1002022.
- Suzuki, M., Kuwata, S., Kataoka, J., Masuta, C., Nitta, N. and Takanami, Y. (1991). Functional analysis of deletion mutants of cucumber mosaic virus RNA3 using an in vitro transcription system. *Virology* 183: 106–113.
- Suzuki, M., Kuwata, S., Masuta, C. and Takanami, Y. (1995). Point mutations in the coat protein of cucumber mosaic virus affect symptom expression and virion accumulation in tobacco. *J. Gen. Virol.* 76: 1791–1799.
- Takanami, Y. (1981). A striking symptoms on cucumber mosaic virus-infected tobacco plants induced by a satellite RNA. *Virology* 109: 120–126.
- Tomaru, K., Sawa, Y., Kubo, S., Kuwata, S. and Suzuki, I. (1985). Tobacco streak virus isolated from tobacco plants in Japan. *Ann. Phytopat. Soc. Japan* 51: 486–489.
- Tsugita, A. and Fraenkel-Conrat, H. (1960). The amino acid composition and C-terminal sequence of a chemically evoked mutant of TMV. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 46: 636–642.
- Wikoff, W.R., Tsai, C.J., Wang, G., Baker, T.S. and Johnson, J.E. (1997). The structure of cucumber mosaic virus: cryoelectron microscopy, X-ray crystallography, and sequence analysis. *Virology* 232: 91–97.
- Xin, H.-W. and Ding, S.-W. (2003). Identification and molecular characterization of a naturally occurring RNA virus mutant defective in the initiation of host recovery. *Virology* 317: 253–262.