【解説】

ウイルス RNA の複製を阻害する 抵抗性遺伝子

石橋和大, 石川雅之

植物のウイルス抵抗性遺伝子には、遺伝様式が優性のものと劣性のものがある。これまでに同定された優性抵抗性遺伝子のほとんどは、ヌクレオチド結合領域とロイシンリッチリピートをもち、特定のウイルスの感染を感知して防御反応を活性化させるスイッチの役割を果たすタンパク質をコードしている。一方、劣性の抵抗性遺伝子の多くは、ウイルスが本来増殖するために利用していた宿主因子をコードする遺伝子の対立遺伝子で、ウイルス因子との親和性を失ったものである。著者らは、トマトモザイクウイルス (ToMV) 抵抗性遺伝子 *Tm-1* の遺伝子産物が、ウイルスの複製タンパク質に結合することによってその機能を阻害するという、既知の抵抗性遺伝子とは異なる機構でウイルス増殖を抑制することを見いだした。

トマト *Tm-1* 遺伝子

1938 年に Holmes によってタバコモザイクウイルス抵抗性遺伝子 *N* がタバコの野生種 *Nicotiana glutinosa* からタバコに導入されて以来⁽¹⁾、多くの作物においてウイルス病防除を目的としてウイルス抵抗性遺伝子の導入が試みられてきた。トマトのトマトモザイクウイルス

(ToMV) 抵抗性遺伝子 *Tm-1* も古くから知られている抵抗性遺伝子のひとつで、ToMV に抵抗性を示す野生種トマト *Solanum habrochaites*⁽²⁾ から耕作種トマト *S. lycopersicum* に種間交配により導入され、ToMV 抵抗性品種の作出に利用されてきた。しかし、*Tm-1* は染色体上の組換え頻度が著しく低い領域に座乗し、ポジショナルクローニングが成功していなかった。

Tm-1 は半優性に遺伝し、ToMV の増殖をプロトプラストレベルでも阻害する。すなわち、*Tm-1* トマトでは ToMV が細胞間移行して感染域を広げる段階ではなく、最初に侵入した細胞内における増殖過程が阻害されていると考えられる。同様にプロトプラストにおけるウイルス増殖を阻害する優性抵抗性遺伝子としてジャガイモ X ウイルス (PVX) に対するジャガイモの *Rx* 遺伝子がよく知られている。*Rx* をもつジャガイモのプロトプラストに PVX と *Rx* 非感受性のウイルスを共感染させると、*Rx* 非感受性のウイルスの増殖も抑制されることから、*Rx* による抵抗性は、PVX 感染を認識することによって誘導される非特異的な防御反応によるものと考えられる。*Rx* 遺伝子はポジショナルクローニングによって同定され、他によくみられる優性ウイルス抵抗性遺伝子産物と同様、ヌクレオチド結合領域-ロイシンリッチリピートを含むタンパク質をコードしていることが明ら

A Plant Resistance Gene that Encodes an Inhibitor of Viral RNA Replication
Kazuhiro ISHIBASHI, Masayuki ISHIKAWA, 独立行政法人農業生物資源研究所

かになった⁽³⁾。

一方、*Tm-1* トマトのプロトプラストに、野生型 (wt) ToMV RNA と、ToMV の *Tm-1* 抵抗性打破変異株である LT1 の RNA を共感染させると、wt ToMV の増殖のみが抑制され、LT1 は正常に増殖した。このことから、*Tm-1* は非特異的な防御反応を介さずに wt ToMV の増殖を阻害していると考えられた⁽⁴⁾。また、LT1 が複製タンパク質コード領域内にアミノ酸置換をもち、このアミノ酸置換が抵抗性の打破に重要であることから、*Tm-1* は複製タンパク質を標的として ToMV の増殖を阻害していると考えられた⁽⁵⁾。これらの特徴から、*Tm-1* は ToMV 複製タンパク質の発現あるいは機能を阻害していると予想された。しかし、*Tm-1* トマトのプロトプラストに wt ToMV を感染させてもウイルスの複製サイクルは進行せず、ウイルス由来のタンパク質や RNA の合成は検出されないため⁽⁶⁾、*Tm-1* が ToMV RNA の翻訳を阻害しているのか、複製を阻害しているのか、それともウイルス分子の安定性に影響しているかは不明であった。

試験管内 ToMV RNA 翻訳・複製系

ToMV のウイルス粒子にはメッセージ RNA として機能する 1 本鎖ゲノム RNA が含まれる。宿主細胞に ToMV が感染すると、ゲノム RNA が脱外被して翻訳される。ゲノム RNA の翻訳によって生じた複製タンパク質はゲノム RNA をオルガネラ膜表面にリクルートして、いくつかの宿主タンパク質とともに複製複合体を形成し、その中で相補鎖 RNA を介して子孫 RNA を複製する。植物 RNA ウイルスの増殖機構の解析を進める上で、この一連の過程を試験管内で再現することは永年の課題であった。

植物細胞には、RNA 分解酵素やタンパク質分解酵素に富む単膜系のオルガネラである液胞が存在する。成熟した体細胞では多くの場合、細胞内容積の大部分を液胞が占め、植物細胞をそのまま破碎すると抽出液は壊れた液胞に由来する各種分解酵素で汚染されてしまう。このため、植物の細胞あるいは組織をそのまま破碎して得た抽出液を用いて試験管内翻訳反応を行なうことは多くの場合できない。そこで筆者らは、タバコ BY-2 細胞のプ

図1 ■ 試験管内 ToMV RNA 翻訳複製反応における *Tm-1* の作用

(A) BYL の調製。タバコ BY-2 プロトプラストをパーコール密度勾配溶液中で遠心分離することにより、液胞を含む密度が軽い小胞と、密度が重い脱液胞化されたプロトプラストに分離することができる。(B) *Tm-1* による試験管内 ToMV RNA 複製反応の阻害。BY-2 脱液胞化プロトプラスト抽出液 (BYL) に *Tm-1* トマト細胞の抽出液を加え、wt ToMV および LT1 RNA の翻訳および複製反応を行なった。複製された RNA (³²P 標識) をゲル電気泳動で分離し、オートラジオグラフィーにより検出した。*Tm-1* トマト細胞抽出液を加えずに反応を行なうと、wt ToMV と LT1 の RNA 複製レベルは同程度となる。

ロトプラストから密度勾配遠心を用いて液胞を除去した後にこれを破碎して無細胞抽出液を調製してみた。すると、この抽出液 (BYL) は RNA 分解酵素やタンパク質分解酵素の活性が低く、高い試験管内翻訳活性を有していた⁽⁷⁾ (図 1)。BY-2 細胞は ToMV の効率よい増殖を許容するため、BYL 中には ToMV RNA の翻訳および複製に必要な因子がすべて存在すると考えられた。そこで、BYL を用いて ToMV のゲノム RNA を翻訳したところ、複製タンパク質が合成され、さらに RNA 合成基質を加えると ToMV RNA の複製が観察された。

Tm-1 が複製タンパク質の合成あるいは機能 (RNA 複製) を阻害しているとすれば、この試験管内 ToMV RNA 翻訳・複製系において Tm-1 による阻害活性が検出できるのではないかと筆者らは考えた。そこで、*Tm-1* をもつトマトから培養細胞を作製し、脱液胞化プロトプラスト抽出液を調製した。BYL に *Tm-1* トマト由来の脱液胞化プロトプラスト抽出液を加えて wt ToMV および LT1 RNA の試験管内翻訳・複製反応を行なったところ、LT1 と比較して wt ToMV の RNA 複製活性がより強く阻害された (図 1)。このような阻害活性は *Tm-1* をもたないトマトの脱液胞化プロトプラスト抽出液からは検出されなかったことから、wt ToMV RNA 特異的複製阻害活性は、*Tm-1* 遺伝子に由来すると考えられた。また、このとき wt ToMV と LT1 の複製タンパク質は同等に蓄積していたことから、*Tm-1* は複製タンパク質の合成あるいは安定性には影響することなく、その機能を阻害することが示唆された。

Tm-1 遺伝子の同定

Tm-1 トマト細胞抽出液中に検出された試験管内 ToMV RNA 複製阻害活性 (Tm-1 活性) を精製することにより、阻害因子の同定を試みた。Tm-1 活性は分画操作中に容易に失活したため、精製は困難をきわめた。クロマトグラフィー担体の種類や用いるバッファーの pH などの条件を検討することにより、活性を保ったまま分画可能な 6 段階の精製方法を確認した。これらを組み合わせて精製を行なったところ、最終精製段階の MonoQ カラムクロマトグラフィーにおいて活性と似たパターンで溶出されるタンパク質 (p80) が検出された。そこで、p80 を LC-MS/MS 解析によって同定し、*Tm-1* トマト (GCR237 系統) から p80 (p80^{GCR237}) cDNA をクローニングした。p80^{GCR237} と類似のアミノ酸配列をもったタンパク質は植物だけでなくカビや細菌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

ないタンパク質であった。試験管内翻訳によって p80^{GCR237} を合成し、試験管内 ToMV RNA 複製系に加えたところ、wt ToMV の RNA 複製反応は阻害されたが、LT1 の複製は阻害されなかった。したがって、p80^{GCR237} が Tm-1 活性を担う因子であることがわかった。

さらに、p80^{GCR237} が *Tm-1* 遺伝子産物そのものであることを確認するために実験を行ない、以下の結果を得た。

① *Tm-1* をもたないトマト (GCR26 系統) から p80 (p80^{GCR26}) cDNA をクローニングしたところ、p80^{GCR237} の cDNA とは塩基配列が異なっていた。試験管内翻訳によって合成した p80^{GCR26} は wt ToMV RNA 複製阻害活性を示さなかった。また、*Tm-1* の起源とされる *S. habrochaites* PI126445 の p80 cDNA 塩基配列は p80^{GCR237} と同一であった。

② *Tm-1* トマトと *Tm-1* をもたないトマトの F2 世代において、p80^{GCR26} は p80^{GCR237} の対立遺伝子としてふるまい、ToMV 抵抗性は p80^{GCR237} と共分離したことから、*Tm-1* と p80^{GCR237} は連鎖していると考えられた。

③ *Tm-1* トマトにおいて Virus-induced gene silencing 法により p80^{GCR237} の発現を抑制したところ、ToMV 抵抗性が喪失した。この結果は、p80^{GCR237} が抵抗性に必須な因子であることを意味すると同時に、ToMV の複製に必要な因子のドミナントネガティブ変異アリルである可能性を否定するものである。

④ p80^{GCR237} を恒常的に発現する形質転換トマトは wt ToMV に対して抵抗性を示し、LT1 の増殖を許容した。以上より、p80^{GCR237} は *Tm-1* 遺伝子産物そのものであり、p80^{GCR26} は ToMV 感受性トマトがもつ劣性の *Tm-1* 対立遺伝子 (*tm-1*) であると考えられた。

Tm-1 は ToMV RNA 複製複合体の形成を阻害する

ToMV RNA の複製は、宿主のオルガネラ膜上に形成された複製タンパク質を含む複合体 (複製複合体) で起こる。BYL から超遠心によって生体膜を除去した membrane-depleted BYL (mdBYL) を用いて試験管内 ToMV RNA 翻訳・複製反応を行なうと、複製タンパク質は合成されるものの、RNA の複製は検出されない。しかし、この ToMV RNA を翻訳した mdBYL 反応液に翻訳阻害剤を添加後、生体膜を加えると、ToMV の RNA 複製が起こる。このように、mdBYL を用いることにより ToMV RNA の翻訳反応と生体膜上での RNA 複製反応を分離することができる⁽⁸⁾。この系を用いて、

p80^{GCR237} (Tm-1) が ToMV RNA 複製のどの段階を阻害するのかを調べた。

試験管内翻訳によって合成した Tm-1 タンパク質を、① ToMV RNA の翻訳前、②翻訳阻害剤の添加後、生体膜の添加前、③生体膜と混合後、RNA 合成基質の添加前のいずれかに加え、wt ToMV RNA 複製阻害の有無を調べた。すると、①翻訳前、あるいは②生体膜の添加前に Tm-1 を加えたときには wt ToMV RNA の複製が阻害されたが、③生体膜と混合後に Tm-1 を加えても阻害活性は検出されなかった。したがって、Tm-1 は生体膜上にすでに形成された複製複合体で起こる RNA 複製反応を阻害することはできず、生体膜上に複製複合体が形成される過程を阻害することが示唆された。

Tm-1 は ToMV の複製タンパク質と結合してその働きを阻害する

ToMV の *Tm-1* 非感受性変異株 LT1 が複製タンパク質にアミノ酸置換をもち、これが *Tm-1* による抵抗性の打破に重要であることから、Tm-1 は ToMV の複製タンパク質を標的にしていると考えられる。そこで、Tm-1 が複製タンパク質に結合するかどうか調べた。試験管内翻訳によって合成した FLAG タグ融合 Tm-1 タンパク

質あるいは tm-1 タンパク質を、wt ToMV あるいは LT1 RNA 翻訳液と混合して抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行なったところ、wt ToMV 複製タンパク質が Tm-1 と共精製された。これに対し LT1 複製タンパク質は共精製されなかった。tm-1 タンパク質と wt ToMV あるいは LT1 複製タンパク質との結合も検出されなかった。増殖が阻害される組み合わせと、結合する組み合わせが一致したことから、Tm-1 は wt ToMV の複製タンパク質と結合することによってその機能を阻害すること、そして LT1 は Tm-1 との結合を免れることによって抵抗性を打破していることが示唆された⁽⁹⁾。

おわりに

ウイルス抵抗性遺伝子がクローニングされる以前から、植物のウイルス抵抗性遺伝子には3つのタイプがあると考えられていた(図2)。すなわち、ウイルスが増殖に利用していた宿主因子が変異して増殖をサポートできなくなったもの、ウイルスの感染を認識して防御反応を誘導するもの、およびウイルス因子の機能を直接阻害するものである。その後、多くのウイルス抵抗性遺伝子がクローニングされたが、それらは前二者いずれかのタイ

図2 ■ 想定される4タイプのウイルス-宿主植物因子間相互作用

ウイルス因子 X は宿主因子 A と結合することによりウイルス増殖をサポートする。A に変異が起こって (A') X と協調して機能できなくなると、ウイルスは増殖できない。また、ウイルス因子 X が B によって認識されると、防御反応が誘導され、ウイルスの増殖は抑制される。ウイルス因子 X に直接結合してその機能を阻害する因子 C が宿主細胞中に存在すると、ウイルスは増殖することができない。Fraser⁽¹⁵⁾ を基に改変

ブであり、明確に阻害因子タイプと考えられる抵抗性遺伝子が同定されたのは Tm-1 が初めてである^(10,11)。明らかになった Tm-1 の作用機作は、「ユニーク」といわれてきた Tm-1 の諸性質を矛盾なく説明するものであった。

Tm-1 は抵抗性打破ウイルスが出現しやすい抵抗性遺伝子として知られているが⁽¹²⁾、Tm-1 抵抗性打破変異株である LT1 の複製タンパク質は Tm-1 タンパク質との阻害的な相互作用から逃れることによって Tm-1 トマト細胞内での増殖能を獲得していることがわかった。阻害的相互作用から逃れるように変化することは、増殖に必須な因子との相互作用を新たに獲得することと比較して容易であると考えられ、これが Tm-1 タイプの抵抗性遺伝子が劣性抵抗性遺伝子よりも打破されやすい理由であると想像できる。一方、防御反応を誘起するタイプの優性抵抗性遺伝子は、ウイルス集団の中に抵抗性打破ウイルスが出現したとしても、誘導された防御反応が抵抗性打破ウイルスもろとも増殖を抑制するため、抵抗性打破ウイルスが生きのびるのは容易ではない。これに対し、Tm-1 は感受性ウイルスの増殖のみを特異的に抑える上、ToMV の複製タンパク質は好んでシスに働く（つまり、翻訳の鋳型となった ToMV RNA 分子そのものを好んで複製の鋳型にする）ため⁽¹³⁾、Tm-1 による阻害を受けない複製タンパク質をコードする変異 ToMV RNA が出現すると、この変異体が優先して複製することになる。これも Tm-1 が打破されやすい原因のひとつになっていると考えられる。

ウイルスが宿主細胞内で増殖するためには、宿主因子を利用して複製することのみならず、宿主から受けるさまざまな阻害を避けることが必要である。もし宿主細胞内にウイルス因子と阻害的に相互作用する因子が存在したとしても、ウイルスはその宿主に適応する際にその相互作用が弱くなる方向に変化するであろう。そもそもウイルスが増殖可能な宿主細胞には、増殖を不可能にしてしまうほど強い阻害因子は存在するはずがないが、これはウイルスがその宿主にすでに適応した結果とも考えることができる。これまでのウイルス増殖機構の研究が、専らウイルスがすでに適応した宿主生物種を用いて行なわれてきたことが、阻害因子タイプの抵抗性遺伝子がこれまで見つかっていなかった原因かもしれない。一方で、ウイルスが感染できない（非宿主）細胞中に同様の阻害的相互作用がどれだけ広く存在し、ウイルスの宿主域の決定に貢献しているかを明らかにすることは今後の課題である。最近、鳥インフルエンザウイルスがヒトの細胞に適応するためには、ヒトの細胞中に存在するウイルスポリメラーゼの阻害因子から逃れるような変異を獲

得することが重要であることが報告された⁽¹⁴⁾。対応する宿主因子の同定には至っていないため、これが Tm-1 と同様の阻害機構によるものかどうかは不明であるが、非宿主細胞に存在する因子とウイルス因子との阻害的相互作用は、宿主の生物種を問わず、広範にウイルス宿主域の決定に貢献しているのかもしれない。だとすれば、ウイルスが感染することができない非宿主生物は、阻害因子タイプの抵抗性遺伝子の宝庫である可能性を秘めている。

文献

- 1) F. C. Holmes : *Phytopathology*, **28**, 552 (1938).
- 2) W. S. Porte, S. P. Doolittle & F. L. Wellman : *Phytopathology*, **29**, 757 (1939).
- 3) A. Bendahmane, K. Kanyuka & D. C. Baulcombe : *Plant Cell*, **11**, 781 (1999).
- 4) R. Yamafuji, Y. Watanabe, T. Meshi & Y. Okada : *Virology*, **183**, 99 (1991).
- 5) T. Meshi, F. Motoyoshi, A. Adachi, Y. Watanabe, N. Takamatsu & Y. Okada : *EMBO J.*, **7**, 1575 (1988).
- 6) Y. Watanabe, N. Kishibayashi, F. Motoyoshi & Y. Okada : *Virology*, **61**, 527 (1987).
- 7) K. Komoda, S. Naito & M. Ishikawa : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 1863 (2004).
- 8) K. Komoda, N. Mawatari, Y. Hagiwara-Komoda, S. Naito & M. Ishikawa : *J. Virol.*, **81**, 2514 (2007).
- 9) K. Ishibashi, K. Masuda, S. Naito, T. Meshi & M. Ishikawa : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 13833 (2007).
- 10) B. C. Kang, I. Yeam & M. M. Jahn : *Annu. Rev. Phytopathol.*, **43**, 581 (2005).
- 11) A. J. Maule, C. Caranta & M. I. Boulton : *Mol. Plant Pathol.*, **8**, 223 (2007).
- 12) J. Pelham, J. T. Fletcher & J. H. Hawkins : *Ann. Appl. Biol.*, **65**, 293 (1970).
- 13) K. W. Buck : *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **354**, 613 (1999).
- 14) A. Mehle & J. A. Doudna : *Cell Host Microbe*, **4**, 111 (2008).
- 15) R. S. S. Fraser : *Annu. Rev. Phytopathol.*, **28**, 179 (1990).