

平成30年杉浦賞論文

## 2. 植物のウイルス防御機構に関する研究

石橋 和 大

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門  
植物・微生物機能利用研究領域 植物微生物機能ユニット

トマトモザイクウイルス (ToMV) 抵抗性遺伝子 *Tm-1* は、野生種のトマトに由来し、トマトの商用品種にも導入されているが、ポジショナルクローニングが困難な領域に座乗するために同定されていなかった。私は、*Tm-1* をもつトマトの細胞抽出液に試験管内で ToMV の RNA 複製を阻害する活性を見出し、これを精製することにより *Tm-1* 遺伝子産物を同定した。*Tm-1* のアミノ酸配列から機能を推測することはできなかったが、*Tm-1* は ToMV の複製タンパク質と結合して複製複合体の形成を阻害することにより ToMV の増殖を妨げていることを明らかにした。また、分子進化学的解析を行い、野生種トマトの *Tm-1* と ToMV は競争的な共進化を経てきたことを示唆する結果を得るとともに、両者の立体構造を決定して共進化の過程におけるタンパク質の構造変化を可視化することに成功した。さらに、*Tm-1* の研究を通して、ウイルスのタンパク質と結合してその機能を阻害する因子は、ウイルスが適応していない生物種には広く存在する可能性があること、ウイルスタンパク質が多機能であることが進化を制約し、宿主域を制限し得ることを示した。

### はじめに

生育不良や枯死を引き起こすウイルス病に対抗するため、植物は様々なウイルス防御機構を備えている。例えば、RNA サイレンシングは植物のウイルス防御に重要な役割を果たす基礎的な防御機構であるが、その重要性を裏付けるように、ほとんどの植物ウイルスは RNA サイレンシングを抑制する機能を獲得している<sup>1)</sup>。また、作物の近縁野生種等にはウイルス感染を許容しない個体が見つかることがあり、ウイルス抵抗性を支配する原因遺伝子は抵抗性遺伝子と総称される。農業において植物ウイルス病の防除は

重要な課題であるが、植物ウイルスに有効な農薬はなく、抵抗性遺伝子を導入した抵抗性品種の育成が有効な手段となっている。これまでに同定されたウイルス抵抗性遺伝子の多くは、共通の一次構造 (ヌクレオチド結合領域—ロイシンリッチ反復配列) を持ち、ウイルスの感染を認識して植物の防御機構を活性化することによりウイルス増殖を抑制する<sup>2)</sup>。私はトマトのトマトモザイクウイルス (ToMV) 抵抗性遺伝子 *Tm-1* を同定し、*Tm-1* が他の抵抗性遺伝子とは異なる独特な機構により ToMV の増殖を抑制していることを明らかにした。また、様々なアプローチにより *Tm-1* の研究を行い、ウイルスと植物の相互作用についていくつか新たな知見を得ることが出来た。

### ToMV 抵抗性遺伝子 *Tm-1*

*Tm-1* は野生種トマト *Solanum habrochaites* に由来し、育種により商業用のトマト品種にも導入されている (図 1)。私が研究を始める以前に、*Tm-1* による ToMV 抵抗性はプロトプラストでも有効であること<sup>3)</sup>、防御反応の活性化が起こらないこと<sup>4)</sup>、*Tm-1* を打破する ToMV 変異株がウイルスの複製を司るタンパク質 (複製タンパク質) のコード領域内に変異をもつこと<sup>5)</sup>などが報告されており、*Tm-1* は他の多くのウイルス抵抗性遺伝子とは作用機構を異にすること、想定される作用機構としてウイルスの複製

### 連絡先

〒 305-8602  
茨城県つくば市観音台 2-1-2  
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構  
生物機能利用研究部門  
植物・微生物機能利用研究領域  
植物微生物機能ユニット  
TEL: 029-838-7009  
FAX: 029-838-7009  
E-mail: bashi@affrc.go.jp



図1 ToMV感染トマト（左）と *Tm-1* を有する ToMV 抵抗性トマト（右）

タンパク質に作用して複製を阻害することが示唆されていた。しかし、*Tm-1* 遺伝子は染色体上の組換え頻度の低い領域に座乗するため、ポジショナルクローニングが成功していなかった<sup>6)</sup>。

植物細胞は液胞が非常に発達しており、植物細胞の抽出液には液胞に含まれる各種分解酵素が多く混じるため、小麦胚芽などの例外を除き生化学実験には不向きであった。2004年に、タバコ培養細胞のプロトプラストからパーコール密度勾配遠心により液胞を除き、その後に破碎した抽出液を用いることにより、ToMVのゲノムRNAが翻訳され複製される過程を試験管内で再現する実験系が確立された<sup>7)</sup>。*Tm-1*がToMV RNAの複製を阻害しているとすれば、*Tm-1*によるToMV RNA複製の阻害が試験管内系で再現できる可能性が考えられた。そこで私は、*Tm-1*をもつトマト（GCR237）より培養細胞ラインを樹立し、この細胞由来の脱液胞化プロトプラスト抽出液を試験管内ToMV RNA翻訳・複製系に加えたときに、ToMV RNAの複製が阻害されることを見出した。この試験管内ToMV RNA複製阻害活性を有するタンパク質を各種クロマトグラフィー等によって精製し、同定した（図2）。遺伝学的な解析等により、当該タンパク質は*Tm-1*遺伝子産物そのものであることがわかった<sup>8)</sup>。これは、植物の病害抵抗性遺伝子を生化学的に同定した現在まで唯一の例である。

#### ***Tm-1* は ToMV 複製タンパク質に結合して ウイルス複製複合体の形成を阻害する**

*Tm-1* 遺伝子と類似の配列をもつ遺伝子は、植物のみならず一部の細菌やカビ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ものであったため、配列から*Tm-1*の機能を推定することはできなかった。抵抗性を打破するToMV変異株が複製タンパク質にアミノ酸置換をもつことから、*Tm-1*と複製タンパク質が結合するか調べたところ、*Tm-1*は野生型ToMVの複製タンパク質と結合し、抵抗性打破変異株の複製タンパク質とは結合し

なかった<sup>8)</sup>。したがって、*Tm-1*はToMVの複製タンパク質と結合することによって複製を阻害し、ウイルスは*Tm-1*との結合を回避するよう進化することによって抵抗性を打破したものと考えられた。

ToMV RNAより翻訳された複製タンパク質は、翻訳と共役して自身のゲノムRNAと結合し、pre-membrane targeting complex (PMTC) と呼ばれるリボヌクレオプロテイン複合体を形成する<sup>9)</sup>。PMTCは自身ではマイナス鎖RNAの合成を開始することができず、生体膜上に複製複合体を形成することにより初めてRNA合成能を獲得する。PMTCの形成は複製タンパク質による複製鋳型のシスの選択と、新たな翻訳開始を阻害することによるゲノムRNAからのリボソームの除去を担っていると考えられている<sup>10,11)</sup>。

試験管内ToMV RNA複製系において、*Tm-1*をPMTCの形成後に添加した場合には複製が阻害されたが、生体膜上に複製複合体を形成した後に*Tm-1*を加えても複製反応の阻害は起きなかったことから、*Tm-1*は複製複合体の形成過程を阻害すると考えられた<sup>8)</sup>。*Tm-1*と結合し、複製阻害を受けた複製タンパク質は、生体膜上に蓄積していたものの、i) 高塩濃度処理で膜から解離すること、ii) ゲノムRNAがスクレアーゼ処理によって分解されること、iii) 免疫沈降を行っても複製複合体の構成因子である宿主膜タンパク質との結合が見られないことなどの点で複製複合体を形成している複製タンパク質とは特性が異なっていた<sup>12)</sup>。これらの結果から、*Tm-1*はPMTCの生体膜との結合は阻害せず、生体膜の構造変化を伴う複製複合体の形成過程を阻害すると考えられた（図3）<sup>13)</sup>。

#### **ToMV と *Tm-1* の競争的共進化**

*Tm-1*は打破されやすいことで知られ、抵抗性品種を導入した圃場に、ほどなく抵抗性打破変異ウイルスが出現したことが報告されている<sup>14)</sup>。それにも関わらず、野生種トマトが*Tm-1*を備えている理由を探るため、*S. habrochaites*がもつ*Tm-1*の塩基配列を調べた。*Tm-1*は754アミノ酸

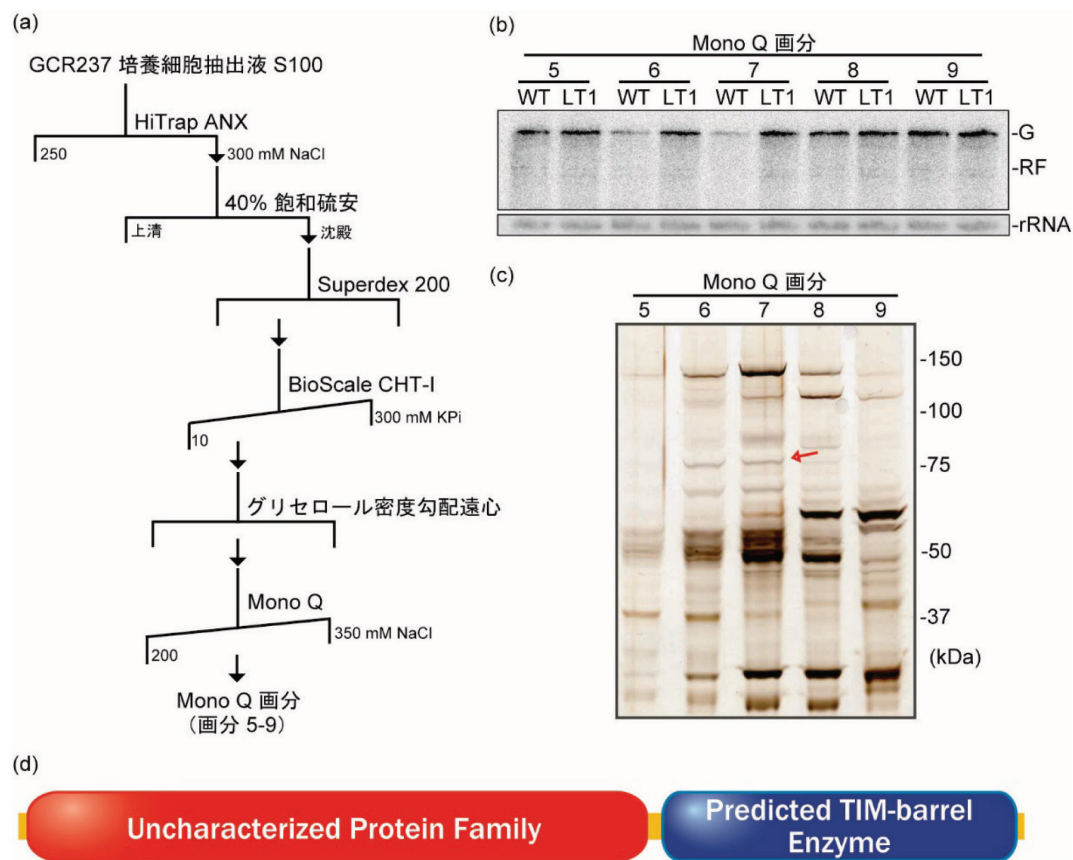


図2 *Tm-1* トマト細胞抽出液からの ToMV RNA 複製阻害因子の精製

(a) 精製のスキーム. (b) 最終精製段階である Mono Q 画分の ToMV RNA 複製阻害活性. 各画分を BYL と混合し, ToMV 野生型株 (WT) および抵抗性打破変異株である LT1 RNA の複製反応を行った. 画分 6 および 7 に ToMV 野生型株特異的 RNA 複製阻害活性が検出された. (c) Mono Q 画分に含まれるタンパク質. 画分 6 および 7 に検出された赤矢印のバンドを切り出して LC-MS/MS により同定した. (d) *Tm-1* タンパク質のドメイン構造. *Tm-1* タンパク質は, 細菌やカビなどにも保存されている 2 つのドメインをもつと予想されたが, そのいずれも機能はわかっていない.

残基からなるタンパク質だが, その中の比較的小さな領域 (79 番目から 112 番目まで) が正の選択 (アミノ酸配列を変える方向に働く自然選択) を受けていた<sup>15)</sup>. このことは, 当該領域のアミノ酸配列がウイルスに対抗するために急速に変化したことを示唆する. また, *S. habrochaites* の中には, より強力に ToMV 複製を阻害する *Tm-1* 対立遺伝子 (*Tm-1*<sup>I91T</sup>) を持つ個体も存在し, *Tm-1* は阻害活性を強めるように進化してきた可能性が考えられた. 一方, ToMV を接種した *S. habrochaites* から *Tm-1*<sup>I91T</sup> をもつ打破する ToMV 変異株も出現した. ToMV 感受性 (*Tm-1* をもたない) 宿主における各 ToMV 変異株の増殖能を調べたところ, 野生型 ToMV > *Tm-1* 打破変異株 > *Tm-1*<sup>I91T</sup> 打破変異株の順に増殖能が高いことがわかった. したがって, ToMV は *Tm-1* による抵抗性を打破するために代償を払っており, 感受性宿主に感染すると野生型に戻る方向に進化するために打破変異がウイルス集団に定着しにくく, 例え打破されやすくとも *Tm-1* をもつことは植物にとって

メリットとなると考えられた.

次に *Tm-1* タンパク質の立体構造解析を試みた. 大腸菌で発現した *Tm-1* タンパク質断片 (1-431) の構造を X 線結晶回折により決定した<sup>16)</sup>. *Tm-1* 断片は二量体として存在し, 正の選択を受けた 79 - 112 番目のアミノ酸残基は分子表面に露出しており, この部分で ToMV 複製タンパク質と結合すると考えられた (図 4). さらに, *Tm-1* 断片と ToMV 複製タンパク質ヘリカーゼドメイン (ToMV-Hel) の複合体の結晶構造を決定したところ, 予想通り *Tm-1* は正の選択領域を介して ToMV-Hel と結合していた (図 5). また, *Tm-1* 抵抗性打破変異株において変化している ToMV-Hel のアミノ酸残基も *Tm-1* との結合に直接関与していた. これらの結果より, *Tm-1* は分子表面を変化させて ToMV 複製タンパク質と結合するよう進化したこと, ToMV は *Tm-1* の標的となるアミノ酸残基を変化させることにより結合から逃れて抵抗性を打破していることがわかった<sup>16)</sup>.

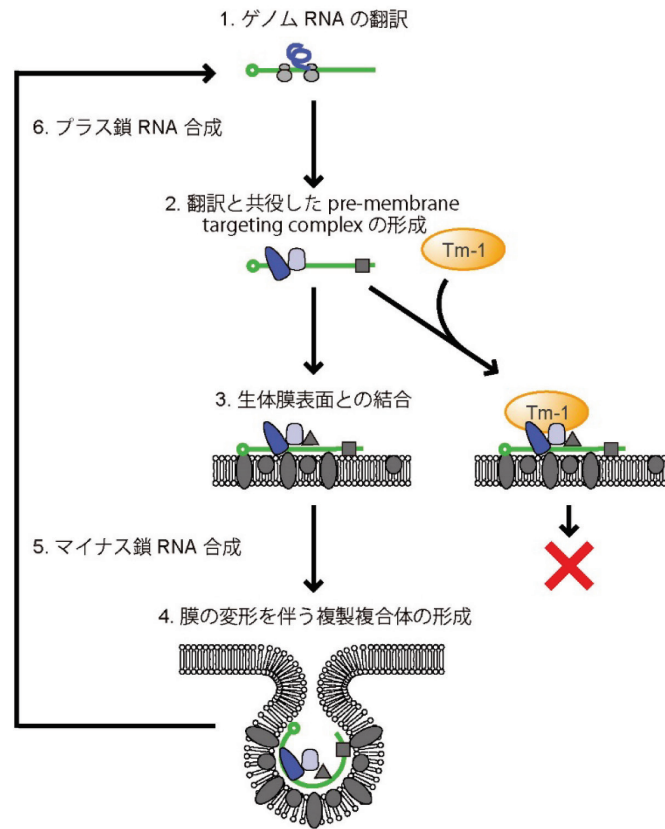


図3 Tm-1 の作用機構モデル

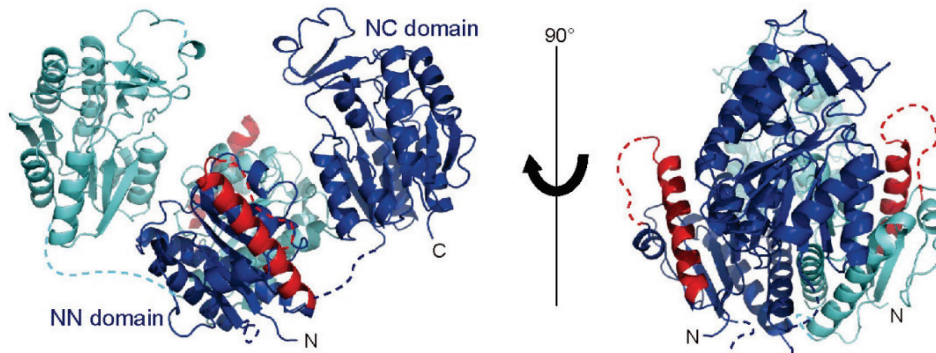


図4 Tm-1 (1-431) 二量体の結晶構造

正の選択を受けた領域 (79-112) を赤で示した. 文献 16) より改変.

Tm-1 と ToMV-Hel の結合には ATP が必要であることが分かっていた. ToMV-Hel は NTPase 活性をもつため<sup>17)</sup>, 複合体の精製および結晶化の際には難加水分解性の ATP アナログ (ATP  $\gamma$ S) を加えていたが, 決定した立体構造では ATP  $\gamma$ S 分子は ToMV-Hel の NTPase 活性中心の他に, Tm-1 と ToMV-Hel との結合境界面に存在し, 両分子と相互作用することにより, 結合を橋渡しする役割を担ってい

ることがわかった (図 5 右)<sup>16)</sup>.

#### 複製阻害がウイルスの宿主域を制限する

ウイルスは限られた範囲の宿主生物種にのみ感染する. 病原体がある生物種のどの個体にも感染できないとき, その生物種を植物病理学用語で非宿主とよぶ. すなわち, あるウイルスにとっては, ほとんどの生物種が非宿主である.

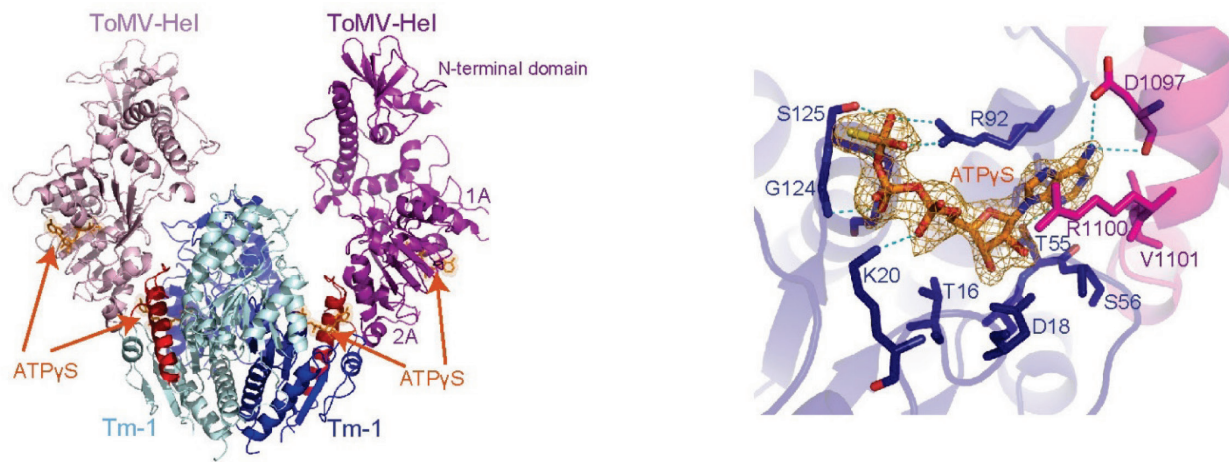


図5 Tm-1 (1-431) と ToMV-Hel 複合体の結晶構造

左) Tm-1 (1-431) 二量体と ToMV-Hel 二分子から成るヘテロ 4 量体の結晶構造. 右) 結合部位に存在する ATP  $\gamma$  S 分子の拡大図. 文献 16) より改変.

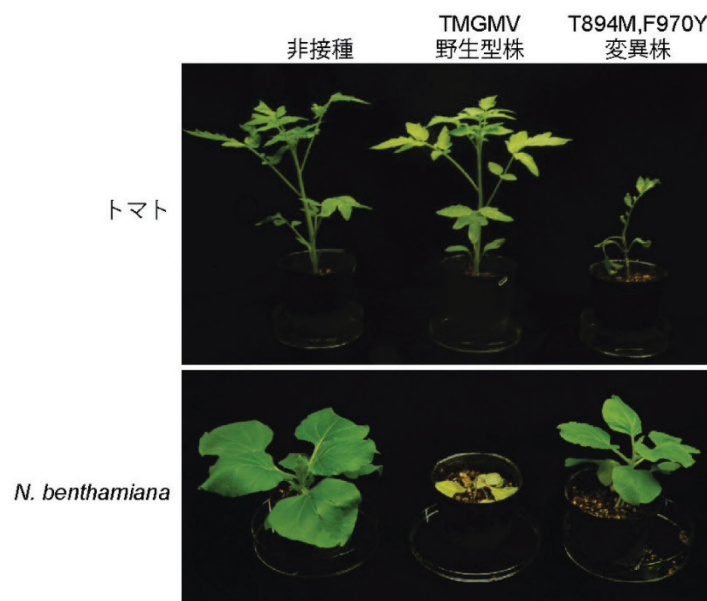


図6 野生型 TMGMV あるいは T894M,F970Y 変異株を接種したトマト (上) および *Nicotiana benthamiana* (下) の病徴

tm-1 から逃れることによりトマトでの複製能を獲得した TMGMV の T894M,F970Y 変異株は, RNA サイレンシング抑制能を喪失し, 元の宿主である *N. benthamiana* における病原性が低下した.

非宿主にウイルスを接種しても見かけ上何も起こらず, また交配による遺伝解析ができないため, ウイルスが非宿主植物に感染できない原因はわかっていなかった.

ToMV 感受性トマトには *Tm-1* の対立遺伝子 *tm-1* が存在する. *tm-1* は, *Tm-1* とアミノ酸配列で 97% の相同性を有しているものの, ToMV の複製タンパク質と結合せず, ToMV RNA 複製も阻害しなかった. ToMV と近縁のタバコ緑斑モザイクウイルス (TMGMV) とトウガラシ微斑ウ

イルス (PMMoV) はいずれもナス科植物を自然宿主とするウイルスであるが, トマトには感染できないことが知られていた. 私は, TMGMV および PMMoV がトマトに感染できない一因が *tm-1* による複製阻害にあることを明らかにした<sup>18)</sup>. これは, 非宿主植物にウイルスが感染できない原因の最初の報告となった. *tm-1* にウイルス複製阻害能がありトマトに感染できないウイルスの増殖を抑制していることは, ToMV はトマトに適応する過程で *tm-1* に

よる阻害から逃れるように進化したことを示唆している。このことを一般化して考えると、このような阻害的な相互作用は、ウイルスと宿主生物の間には見つからなくとも、ウイルスが適応していない生物種には広く存在している可能性がある。

tm-1 を発現する形質転換タバコに TMGMV を接種することにより、tm-1 による阻害を打破する変異 TMGMV (T894M, F970Y 変異株) を得ることができた。T894M, F970Y 変異株は複製タンパク質ヘリカーゼドメインにアミノ酸置換を有しており、tm-1 との結合能が低下していた<sup>18)</sup>。この TMGMV 変異株をトマトに接種したところ、低効率ながら全身感染し、壊死を伴う激しい病徴を示した (図 6 上)。TMGMV はタバコ近縁種の *Nicotiana benthamiana* に感染すると著しく増殖して植物を枯死させるが、T894M, F970Y 変異株は *N. benthamiana* に顕著な病原性を示さなかった (図 6 下)<sup>19)</sup>。TMGMV を含むトバモウイルス属ウイルスの複製タンパク質は、複製を行うだけでなく、宿主の防御機構である RNA サイレンシングを抑制する働きももつ<sup>20,21)</sup>。T894M, F970Y 変異株の複製タンパク質を解析したところ、RNA サイレンシング抑制能が低下していることがわかった<sup>19)</sup>。すなわち、非宿主であるトマトにおける複製能の獲得と引き換えに、宿主への感染に重要な RNA サイレンシング抑制能を喪失したと考えられる。ウイルスゲノムは小さく保たれた中に多くの情報を詰め込む必要があるため、多くのウイルスタンパク質は多機能であるが、ここで得られた結果は、ウイルスタンパク質が多機能であることがウイルスの進化を制約する要因であり、これにより宿主域が制限されることを示唆している。

#### おわりに

ウイルス学は基本的に「各論」の学問であるが、その中でも研究者人口が比較的少ない植物ウイルスの、しかも大多数とは異なるタイプの抵抗性遺伝子である *Tm-1* に関する一連の研究は、ニッチの中のニッチの研究と言えるかもしれない。そのような研究を 10 年以上続けることができ、また、日本ウイルス学会杉浦奨励賞をいただくような成果を挙げることができたのは、多くの幸運と周りの方々のご理解に恵まれたことが大きい。この度の受賞を励みに、伝統ある日本の植物ウイルス研究の灯を絶やさないよう、今後も植物ウイルスの研究を継続していきたい。

#### 謝辞

本研究の遂行にあたり、農研機構生物機能利用研究部門植物微生物機能ユニットの石川雅之ユニット長には終始温かいご指導を賜りました。Tm-1 の立体構造は農研機構高度解析センターの加藤悦子博士および立命館大学の松村浩由教授との共同研究により決定することができました。野生種トマトにおける *Tm-1* の分子進化的解析では東北大

学の宮下脩平助教および東京大学の岸野洋久教授との共同研究により成果を挙げることができました。その他多くの共同研究者や同僚、研究補助員の方々に支えていただき、本研究を行うことができました。この場をお借りして心より感謝申し上げます。最後に、本賞にご推薦くださいました鈴木信弘先生、奥野哲郎先生、石川雅之博士に厚く御礼申し上げます。

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

#### 引用文献

- 1) Pumplin N, Voinnet O: RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat Rev Microbiol* 11:745-760, 2013.
- 2) De Ronde D, Butterbach P, Kormelink R: Dominant resistance against plant viruses. *Front Plant Sci* 5:307, 2014.
- 3) Motoyoshi F, Oshima N: Expression of Genetically Controlled Resistance to Tobacco Mosaic Virus Infection in Isolated Tomato Leaf Mesophyll Protoplasts. *J Gen Virol* 34:499-506, 1977.
- 4) Yamafuji R, Watanabe Y, Meshi T, Okada Y: Replication of TMV-L and Lta1 RNAs and their recombinants in TMV-resistant *Tm-1* tomato protoplasts. *Virology* 183:99-105, 1991.
- 5) Meshi T, Motoyoshi F, Adachi A, Watanabe Y, Takamatsu N, Okada Y: Two concomitant base substitutions in the putative replicase genes of tobacco mosaic virus confer the ability to overcome the effects of a tomato resistance gene, *Tm-1*. *EMBO Journal* 7:1575-1581, 1988.
- 6) Ohmori T, Murata M, Motoyoshi F: Molecular characterization of RAPD and SCAR markers linked to the *Tm-1* locus in tomato. *Theor Appl Genet* 92:151-156, 1996.
- 7) Komoda K, Naito S, Ishikawa M: Replication of plant RNA virus genomes in a cell-free extract of evacuated plant protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:1863-1867, 2004.
- 8) Ishibashi K, Masuda K, Naito S, Meshi T, Ishikawa M: An inhibitor of viral RNA replication is encoded by a plant resistance gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:13833-13838, 2007.
- 9) Komoda K, Mawatari N, Hagiwara-Komoda Y, Naito S, Ishikawa M: Identification of a Ribonucleoprotein Intermediate of Tomato Mosaic Virus RNA Replication Complex Formation. *J Virol* 81:2584-2591, 2007.
- 10) Kawamura-Nagaya K, Ishibashi K, Huang YP, Miyashita S, Ishikawa M: Replication protein of tobacco mosaic virus cotranslationally binds the 5' untranslated region of genomic RNA to enable viral replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:E1620-E1628, 2014.
- 11) Ishibashi K, Ishikawa M: Replication of Tobamovirus RNA. *Annu Rev Phytopathol* 54:55-78, 2016.

- 12) Ishibashi K, Ishikawa M: The Resistance Protein Tm-1 Inhibits Formation of a Tomato Mosaic Virus Replication Protein-Host Membrane Protein Complex. *J Virol* 87:7933-7939, 2013.
- 13) Ishibashi K, Ishikawa M: Mechanisms of tomato mosaic virus RNA replication and its inhibition by the host resistance factor Tm-1. *Curr Opin Virol* 9:8-13, 2014.
- 14) Pelham J, Fletcher JT, Hawkins JH: The establishment of a new strain of tobacco mosaic virus resulting from the use of resistant varieties of tomato. *Ann Appl Biol* 65:293-297, 1970.
- 15) Ishibashi K, Mawatari N, Miyashita S, Kishino H, Meshi T, Ishikawa M: Coevolution and Hierarchical Interactions of *Tomato mosaic virus* and the Resistance Gene *Tm-1*. *PLoS Pathog* 8:e1002975, 2012.
- 16) Ishibashi K, Kezuka Y, Kobayashi C, Kato M, Inoue T, Nonaka T, Ishikawa M, Matsumura H, Katoh E: Structural basis for the recognition-evasion arms race between *Tomato mosaic virus* and the resistance gene *Tm-1*. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:E3486-E3495, 2014.
- 17) Xiang H, Ishibashi K, Nishikiori M, Jaudal MC, Ishikawa M, Katoh E: Expression, purification, and functional characterization of a stable helicase domain from a tomato mosaic virus replication protein. *Protein Expr Purif* 81:89-95, 2012.
- 18) Ishibashi K, Naito S, Meshi T, Ishikawa M: An inhibitory interaction between viral and cellular proteins underlies the resistance of tomato to nonadapted tobamoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:8778-8783, 2009.
- 19) Ishibashi K, Meshi T, Ishikawa M: Gaining Replicability in a Nonhost Compromises the Silencing Suppression Activity of *Tobacco Mild Green Mosaic Virus* in a Host. *J Virol* 85:1893-1895, 2011.
- 20) Kubota K, Tsuda S, Tamai A, Meshi T: Tomato Mosaic Virus Replication Protein Suppresses Virus-Targeted Posttranscriptional Gene Silencing. *J Virol* 77:11016-11026, 2003.
- 21) Ding XS, Liu J, Cheng NH, Folimonov A, Hou YM, Bao Y, Katagi C, Carter SA, Nelson RS: The *Tobacco mosaic virus* 126-kDa protein associated with virus replication and movement suppresses RNA silencing. *Mol Plant-Microbe Interact* 17:583-592, 2004.

# Studies of a plant antiviral defense system that inhibits viral RNA replication

**Kazuhiro ISHIBASHI**

Institute of Agrobiological Sciences, NARO  
bashi@affrc.go.jp

*Tm-1* is a semi-dominant resistance gene of tomato against tomato mosaic virus (ToMV). I identified the *Tm-1* gene product through biochemical purification of an inhibitor of *in vitro* ToMV RNA replication from a tomato cell extract. Tm-1 protein binds ToMV replication proteins and inhibits formation of ToMV replication complex. Replication proteins of resistance-breaking ToMV mutants did not bind Tm-1, suggesting that ToMV mutants break the resistance by escaping the inhibitory interaction. Through molecular evolutionary approach, I found that a small part of the *Tm-1* gene is under positive selection, suggesting that this region underwent rapid amino acid changes against selective pressure by ToMV infection. Crystal structures of a fragment of the Tm-1 protein and a complex between the Tm-1 fragment and a ToMV helicase domain fragment of replication proteins revealed that Tm-1 and ToMV have coevolved by changing both sides of the interaction interface. ToMV-susceptible tomato cultivars have a *Tm-1* allele, *tm-1*, whose product neither binds to ToMV replication proteins nor inhibits RNA replication. I found that *tm-1* inhibits multiplication of tobacco green mild mosaic virus (TMGMV) and pepper mild mottle virus (PMMoV), which does not adapt to tomato. A TMGMV mutant that can escape the inhibition by *tm-1* lost the ability to suppress RNA silencing. Therefore, the multifunctionality of replication proteins is an evolutionary constraint of tobamoviruses that restricts their host ranges.