

高度侵入警戒病害ペピーノモザイク病に対する 分子耐性機構を利用した予防技術の確立

山次 康幸

東京大学大学院農学生命科学研究科 特任准教授

緒 言

植物ウイルスは世界中で多様な作物生産に甚大な被害を与えている。植物ウイルスによる世界の作物生産の損失額は年間約6兆円に及ぶと考えられている。植物ウイルス病の最も深刻な課題は根本的な治療法がないことである。菌類病や細菌病のように病原が生物ではないため、病原菌独自の代謝系を阻害するような化学物質の合成は極めて困難であり、これまでに植物ウイルスに対する化学農薬は開発されていない。

現状のところ植物ウイルスに対する最も効果的な防除法のひとつが抵抗性育種である。抵抗性育種によりウイルス抵抗性品種が得られれば、ウイルス病による被害が劇的に軽減される。しかし、抵抗性育種にもいくつかの課題がある¹⁾。その一つは利用できる抵抗性遺伝子の種類に限りがあるため、ウイルスの素早く多様な変異に対応することができず、たびたび打破されてきた点である。したがって、ウイルスに対して打破されにくく、強固な抵抗性を維持するためには作用機序の異なる多様な抵抗性遺伝子を準備することが重要である。

あらゆる植物は病害抵抗性を備えており、それらを総称して植物免疫と呼ぶ。植物免疫には様々な作用機序のものがあることが知られており、植物ウイルスに対する抵抗性育種にはNB-LRR遺伝子が抵抗性遺伝子資源として用いられてきた²⁾。NB-LRR抵抗性遺伝子は植物ウイルスタンパク質を認識することにより防御応答経路を活性化し、プログラム細胞死を誘導してウイルスを死細胞に閉じ込める。筆者らは新たにレクチンをコードするJAX1が植物ウイルスに抵抗性を示すことを明らかにし、レクチン抵抗性と名付けた³⁾。JAX1による抵抗性の作用機序は不明であるものの、従来型抵抗性の様々な指標が観察されないため、レクチン抵抗性は新たな作用機序を持つウイルス抵抗性であると考えられる。

ペピーノモザイク病はトマトに果実の奇形、葉のモザイクなどの病徴を引き起こし、トマト生産に甚大な被害

を与える⁴⁾。特にヨーロッパで猛威を奮っており、1999年にオランダのトマトに発生したのを皮切りに、2011年までにヨーロッパ全域に感染範囲を拡大した。さらに、ペピーノモザイク病は北米、アジア、アフリカにも感染域を拡大しつつある。我が国への侵入も高度に警戒されており、侵入時に備えて既にペピーノモザイク病を検出する診断キットが国内向けに販売されている。

ペピーノモザイク病の病原である pepino mosaic virus (PepMV) はポテックスウイルスというグループに含まれる植物ウイルスである。ポテックスウイルスに対する抵抗性遺伝子はこれまでにRxとJAX1の2つが報告されている²⁾。Rx遺伝子はジャガイモ由来のNB-LRR遺伝子の1種であり、ポテックスウイルスに幅広く抵抗性を示すが、約10%の頻度で抵抗性打破ウイルスが発生する⁵⁾。また、Rx抵抗性打破ウイルス変異株では外被タンパク質(CP)遺伝子に変異が認められることから、Rxタンパク質によるCPの認識が阻害されることにより抵抗性が打破されると考えられている⁵⁾。一方で、JAX1はアブラナ科由来のレクチン遺伝子の1種であり、ポテックスウイルスに幅広く抵抗性を示す³⁾。JAX1は細胞レベルでウイルス増殖を阻害する強固なウイルス抵抗性を示すが、抵抗性打破の有無や程度、メカニズムについては不明である。そこで、本研究ではJAX1によるウイルス抵抗性の打破とそのメカニズムに関する解析を行った。

結 果

まず、JAX1を恒常的に発現する形質転換 *Nicotiana benthamiana* (35S::JAX1) にポテックスウイルスの1種である potato virus X (PVX) を通常接種法であるアグロインフィルトレーション法により接種したが抵抗性を打破するウイルスは現れなかった(図1)。そこで、より効率よくウイルスを接種するために、接ぎ木を利用した接種法を試みた。野生型 *N. benthamiana* (WT) を台

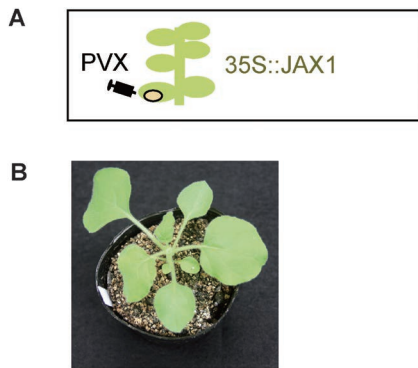


図1 JAX1による抵抗性は通常のウイルス接種により打破されない

A. 通常接種法によるJAX1形質転換植物へのウイルス接種。
B. ウイルス接種5日後の写真。ウイルス病徴は観察されない。

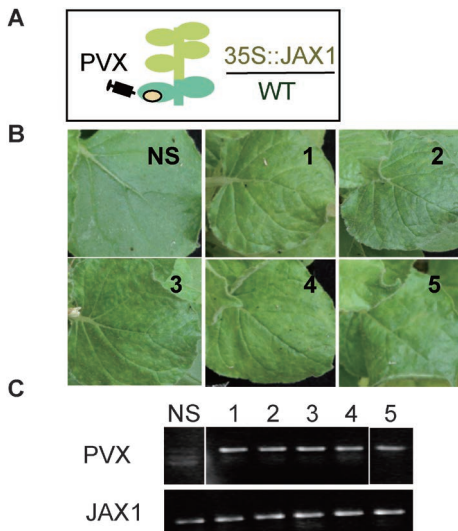


図2 JAX1による抵抗性はウイルスの接ぎ木接種により打破される

A. 接ぎ木接種法によるウイルス接種。野生型植物(台木)にJAX1高発現植物(穂木)を接いだうえで、台木部分にウイルスを接種した。B. ウイルス接種4週間後の写真。ウイルス病徴が観察されなかった植物(NS)と観察された植物(1-5)。C. ウイルスRNAとJAX1 RNAのRT-PCRによる検出。

木として35S::JAX1を接ぎ木し、台木のWTにウイルスを接種する接ぎ木接種を行った(図2A)。その結果、JAX1を発現する上位葉にモザイク症状を呈するウイルス株が複数認められた(図2B)。これらから全RNAを抽出しRT-PCRを行った結果、病徴が観察されたいずれの植物体からもウイルスが検出された(図2C)。これらの抵抗性打破ウイルス株の全塩基配列を解読したところ、複製酵素遺伝子に変異をもつ2種類のPVX変異体(JB1、JB2)が得られた(図3)。JB1、JB2ともに1092番目の塩基が変異して複製酵素の336番目のグルタミン

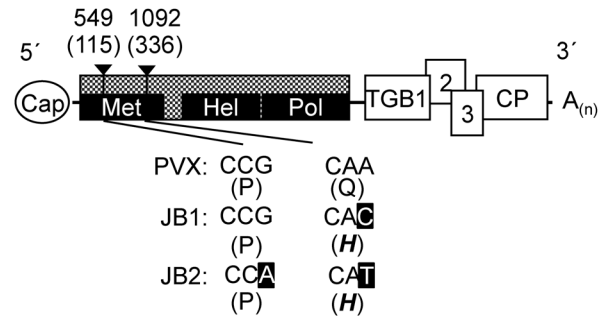


図3 抵抗性打破株のシーケンス解析

JAX1による抵抗性を打破したウイルス分離株は2種類の変異を生じていた(変異塩基は白抜きで表示)。いずれも複製酵素336番目のグルタミン酸QがヒスチジンHに変異していた。

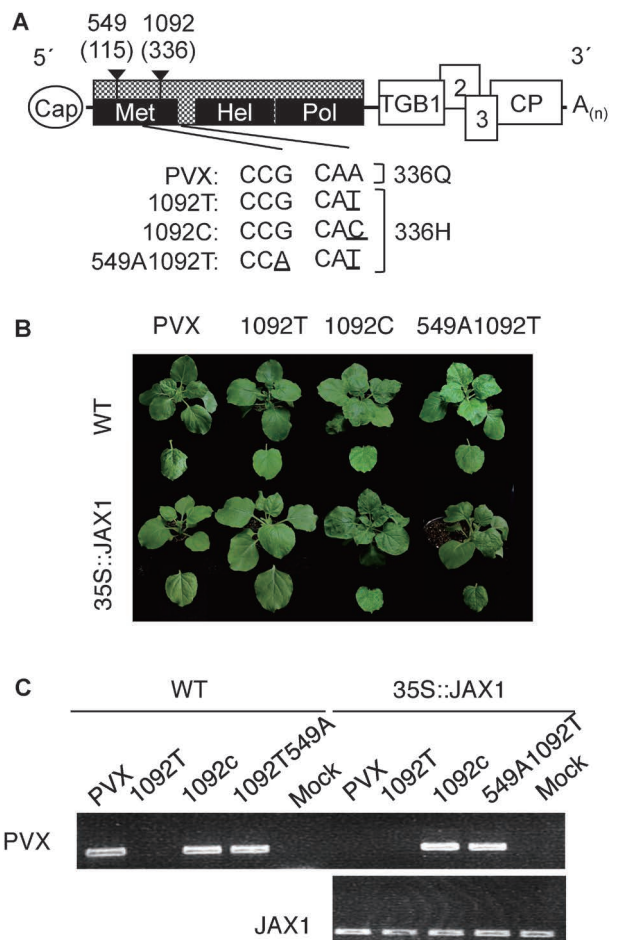


図4 Q336H変異体はJAX1形質転換体に感染した

A. PVX複製酵素の336番目のアミノ酸をQからHに置換した変異体の模式図。変異導入塩基に下線。B. 変異PVXを接種した野生型およびJAX1形質転換体の14日後の病徴。C. RT-PCRによる各接ぎ木植物の上葉におけるウイルスRNAとJAX1 RNAの検出。

酸がヒスチジンに変異する非同義置換を生じていた。JB2はさらに549番目の塩基が変異していたがアミノ酸の変異を伴わない同義置換であった。

これらの変異体に生じた変異がJAX1抵抗性の打破に
関与するかどうかを調べるため、JB1とJB2に相当する
PVX変異体(それぞれ1092C、549A1092T)を作出した
(図4A)。また、1092番目の塩基をTに置換した変異体
1092Tも作出した。これらを野生型およびJAX1形質転
換植物に接種した結果、それぞれJB1とJB2に相当する
1092Cと549A1092Tはいずれの植物においても全身感
染した(図4B)。一方で、1092Tはいずれにおいても全
身感染しなかった。これらの結果はRT-PCRによっ
て確認された(図4C)。以上の結果より、Q336の変異に
よりJAX1抵抗性が打破されることが示唆された。

PVX複製酵素のQ336付近の領域をポテックスウイルス
の間でアラインメントしたところ、Q336がポテックス
ウイルスの間で広く保存されていることがわかった
(図5)。このことから、JAX1はこのアミノ酸を認識す

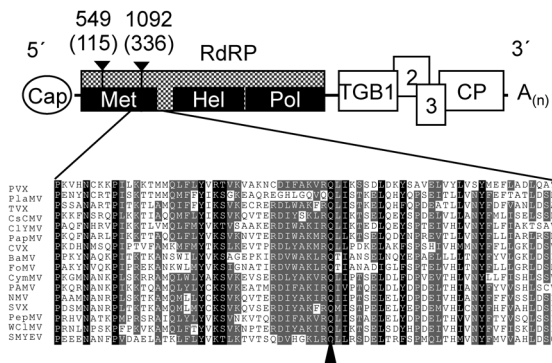


図5 複製酵素の336Qはポテックスウイルスで広く保存されている

ポテックスウイルスの複製酵素のQ336付近の配列のアライン
メント。矢頭はQ336を示す。

ることで広くポテックスウイルスの感染を阻害している
と考えられた。

考 察

これまでに10以上の植物ウイルス抵抗性遺伝子が単離
されているが、抵抗性打破ウイルスの出現頻度は大きく
異なる¹⁾。例えばtomato mosaic virusに対するトマト由
来の抵抗性遺伝子Tm-1は打破されやすく、同じくトマ
ト由来のTm-2²⁾は打破されにくい。ポテックスウイルス
に対する抵抗性遺伝子であるRxも打破されにくいタイ
プの抵抗性遺伝子だとされているが、Rx形質転換植物に
汁液接種によりPepMVを接種すると約10%の割合で打
破株が出現した⁵⁾。本研究では汁液接種よりも効率のよ
いアグロインフィルトレーション法によりウイルスを接
種したが、JAX1抵抗性打破ウイルスを得ることができ
なかった(図1)。一方、最も抵抗性打破ウイルスの出現
しにくい抵抗性遺伝子としてtobacco mosaic virusに対
する*Nicotiana glutinosa*由来の抵抗性遺伝子Nが知られ
ているが¹⁾、Nに対する抵抗性打破ウイルスは接ぎ木接
種法により得られている⁶⁾。そこで本研究でも接ぎ木接
種法を導入したところ、JAX1抵抗性打破ウイルスが生
じた。以上のことから、JAX1はNに匹敵するほど抵抗
性が打破されにくい抵抗性遺伝子であると考えられる。

JAX1抵抗性の打破されにくい性質はJAX1抵抗性の
特徴と関連すると考えられる。植物ウイルスは感染細胞
中では、ゲノム配列に様々な変異を持つ膨大なウイルス
の集合体として存在すると考えられていて、この集団は
quasispeciesとよばれている¹⁾。そのため、抵抗性遺伝

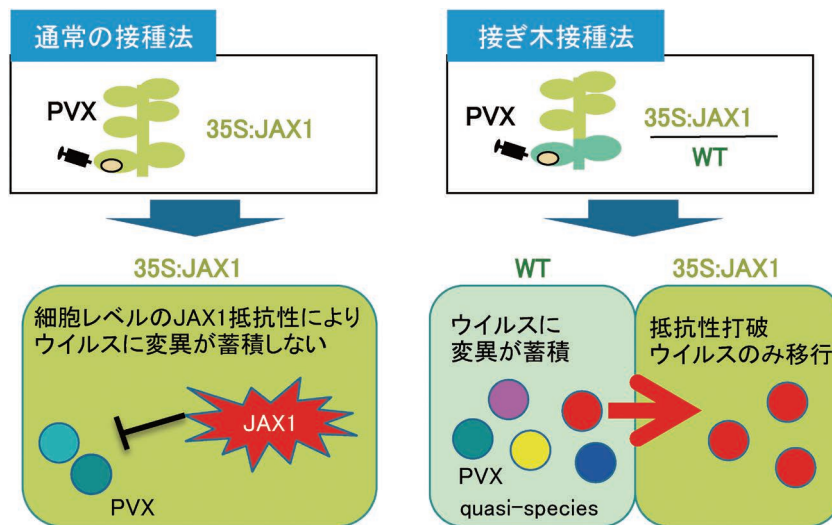


図6 JAX1抵抗性打破株の発生模式図

子を打破する変異ウイルスもこのquasispeciesの集団中から派生してくると考えられる。しかし、JAX1によるウイルス抵抗性は単細胞レベルでウイルス増殖を阻害する強固なウイルス抵抗性であることが明らかにされている³⁾。したがって、通常の接種法では、JAX1形質転換植物においてウイルスが打破株を生じるのに十分なquasispeciesの集団を増殖する前に不活化されてしまうために、打破株が生じ得ないと考えられる。一方で、接ぎ木接種法では野生型植物の台木中でウイルスが十分に増殖することにより、十分なquasispeciesの集団を確保できるため、JAX1形質転換植物の穂木中で打破株を生じ得ると考えられる(図6)。以上より、JAX1による細胞レベルの抵抗性はウイルスに変異する機会を与えないほど強力であると考えられる。

JAX1はアブラナ科のシロイヌナズナから単離した抵抗性遺伝子であるが、トマトと同じナス科の*Nicotiana benthamiana*でウイルスに抵抗性を示す。また、JAX1がポテックスウイルスの中で系統的に離れている4種のウイルス全てに対して強固な抵抗性を示すことを明らかにしている。そのためトマトにおいてJAX1を発現させることによりPepMVにも抵抗性を示すことが強く期待される。本研究ではJAX1が抵抗性打破株の生じにくい優れた抵抗性遺伝子であることを示したが、JAX1とRxは作用機序が異なる抵抗性遺伝子であるため併用が可能であると考えられる。JAX1とRxの両方を持つトマトを作出することにより、より強固な抵抗性をもつトマト品種の作出が可能になると期待され、トマトの安定生産・供給に貢献すると期待される。また、レクチン抵抗性の応用によりNB-LRR遺伝子による抵抗性のみ依存していたウイルス病抵抗性育種に新たな選択肢が加えられ、NB-LRR遺伝子とレクチン遺伝子の併用により打破されにくく強固なウイルス抵抗性が可能になると期待される。

要 約

高度侵入警戒病害ペピーノモザイク病予防技術確立を目的として、同病の病原であるPepMVを含むポテックスウイルスに対する抵抗性遺伝子JAX1の抵抗性打破に関する研究を行った。通常接種法では打破ウイルスが発生せず、接ぎ木接種法によって初めて打破ウイルスが生じたことから、JAX1は最も抵抗性の打破されにくい抵抗性遺伝子にひとつであることを示した。接ぎ木接種法により得られたウイルスは複製酵素遺伝子に変異を生じていたことから、ウイルスの複製酵素がJAX1抵抗性に関わることを明らかにした。本研究によりJAX1がポテックスウイルスの防除に有望な抵抗性遺伝子であることを明らかにした。既存の抵抗性遺伝子との併用により打破されにくく強固なウイルス抵抗性の付与が可能になると期待される。

謝 辞

本研究は公益財団法人三島海雲記念財団の平成25年度学術研究助成金により行われました。ご支援を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団ならびに関係者の皆様に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) R. Hull: *Plant Virology Fifth Edition*. Academic Press, 2013.
- 2) K. K. Mandadi, K. B. G. Scholthof: *Plant Cell*, **25**, 1489–1505, 2013.
- 3) Y. Yamaji, et al.: *Plant Cell*, **24**, 778–793, 2012.
- 4) I. M. Hanssen, B. P. Thomma: *Mol. Plant Pathol.*, **11**, 179–189, 2010.
- 5) T. Candresse, et al.: *Mol. Plant Microbe Interact.*, **23**, 376–383, 2010.
- 6) M. Zaitlin: *Phytopathology*, **52**, 1222–1223, 1962.