

トマト *Tm-1* 遺伝子によるトマトモザイクウイルス 増殖抑制機構の研究

学位論文内容の要旨

ウイルス病の防除は農業における重要な課題のひとつである。最も有効なウイルス病対策として、抵抗性遺伝子の利用が挙げられる。これまでに、多くの植物ウイルス抵抗性遺伝子が同定されているが、そのほとんどは、ウイルスの感染を感知してウイルスに対する自己防御反応を活性化するスイッチの働きを担うものであった。これに対し、トマト (*Solanum lycopersicum*) の *Tm-1* は、過敏反応を誘起することなく、半優性にトマトモザイクウイルス (ToMV) の 1 細胞内での増殖を抑制するユニークなウイルス抵抗性遺伝子である。*Tm-1* 遺伝子は、1940 年代にトマトの近縁野生種 *S. habrochaites* から育種的に導入され、トマトモザイク病の被害の軽減に貢献してきたが、染色体上の組み換え頻度の低い領域に座乗していること等の障害によりポジショナルクローニングが成功していない。*Tm-1* による増殖阻害を受けない ToMV 変異株 (LT1) が複製タンパク質コード領域内にアミノ酸置換をもつことから、*Tm-1* は ToMV 複製タンパク質の発現あるいは機能を阻害すると予想された。

本研究では、*Tm-1* 遺伝子を同定し、どのような機構で ToMV の増殖を抑制しているのかを明らかにすべく解析を行った。

最近、脱液胞化したタバコ BY-2 プロトプラストの抽出液 (BYL) を用いることにより、ToMV のゲノム RNA から複製タンパク質が翻訳され、ゲノム RNA が複製タンパク質により複製される過程を全て試験管内で行う系が確立された (Komoda *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 1863-1867 [2004])。 *Tm-1* が ToMV 複製タンパク質に作用して ToMV RNA の複製段階を阻害するとすれば、この系を利用して、*Tm-1* による ToMV RNA の複製阻害活性が試験管内で検出できる可能性がある。そこで、*Tm-1* を持つトマトより培養細胞ラインを樹立し、この培養細胞から脱液胞化プロトプラスト抽出液を調製した。BYL を用いた試験管内 ToMV RNA 翻訳複製系に *Tm-1* トマト細胞の脱液胞化プロトプラスト抽出液を加え、野生型 (WT) ToMV あるいは *Tm-1* 抵抗性打破変異株である LT1 の RNA をそれぞれ試験管内翻訳複製させたところ、LT1 と比較して WT ToMV の RNA 複

製が顕著に抑制された。 *Tm-1* を持たないトマトの抽出液にはこのような活性は検出されなかったことから、この抑制活性は、 *Tm-1* 遺伝子産物に由来するものと考えられた。そこで ToMV RNA 複製抑制因子を同定するため、各種クロマトグラフィー等を用いた 6 段階からなる分画操作により活性を精製し、活性画分に含まれるタンパク質 (p80) を LC-MS/MS 法により同定した。 *Tm-1* を持つトマト由来の p80 (p80^{GCR237}) cDNA 塩基配列は、 *Tm-1* を持たないトマト由来 p80 (p80^{GCR26}) の配列と異なり、 *Tm-1* が由来したとされる野生種トマト *Solanum habrochaites* のものと同一であった。試験管内翻訳により合成した p80^{GCR237} は、試験管内 ToMV RNA 複製抑制活性を有していたが、 p80^{GCR26} は活性を示さなかった。 p80 と類似のアミノ酸配列を持つタンパク質は、植物界のみならずカビや細菌にも見出すことができたが、それらはいずれも機能が知られていないものであった。

次に、生体内での p80 の ToMV 増殖に対する影響を調べた。 Virus-Induced Gene Silencing 法により *Tm-1* トマトにおいて p80^{GCR237} の発現を抑制したところ、ToMV 抵抗性が打破された。また、 p80^{GCR237} cDNA を恒常的に発現する形質転換トマトは、 WT ToMV に抵抗性を示し、 LT1 の増殖を許容した。さらに、 *Tm-1* トマトと *Tm-1* を持たないトマトとの F2 世代植物において、 WT ToMV 抵抗性と p80^{GCR237} は共分離した。以上より、 p80^{GCR237} が *Tm-1* 遺伝子産物であることが示唆された。

また、 *Tm-1* による ToMV RNA 複製阻害機構の生化学的解析を行った。 *Tm-1* により RNA 複製が抑制されたときにも、 WT ToMV の複製タンパク質は正常に蓄積していることから、 *Tm-1* は複製タンパク質の合成あるいは安定性には影響を与えずに、その機能を阻害することが示唆された。試験管内翻訳系を利用した免疫沈降解析を行ったところ、 p80^{GCR237} (*Tm-1*) と WT ToMV 複製タンパク質との相互作用が検出された。しかし、 LT1 の複製タンパク質との相互作用は検出されなかった。 p80^{GCR26} と、 WT ToMV あるいは LT1 複製タンパク質の相互作用は、いずれも検出されなかった。これらの結果より *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、 LT1 は *Tm-1* との結合から逃れることによって抵抗性打破能を獲得したことが示唆された。また、試験管内 ToMV RNA 翻訳複製系において、生体膜成分よりも後に *Tm-1* を加えても阻害活性が検出されないことから、 *Tm-1* は生体膜上に既に形成された RNA 複製複合体の機能は阻害できないことが示唆された。さらに阻害を受けた ToMV 複製タンパク質の様態解析を行うことにより、 *Tm-1* は複製タンパク質と生体膜の結合は阻害せず、複製複合体の形成過程において生体膜上で起こる状態変化を阻害することを明らかにした。以上の知見より得られた *Tm-1* による ToMV RNA 複製阻害機構のモデルを提示する。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 藤 哲

副 査 教 授 上 田 一 郎

副 査 教 授 伴 戸 久 徳

副 査 上級研究員 石 川 雅 之 ((独) 農業生物資源研究
所・植物科学研究領域)

学 位 論 文 題 名

トマト *Tm-1* 遺伝子によるトマトモザイクウイルス 増殖抑制機構の研究

本論文は、和文 55 頁、16 図からなり、参考論文 1 編が添付されている。

ウイルス病の防除は農業における重要な課題のひとつである。最も有効なウイルス病対策として、抵抗性遺伝子の利用が挙げられる。これまでに、多くの植物ウイルス抵抗性遺伝子が同定されているが、そのほとんどは、ウイルスの感染を感知してウイルスに対する自己防御反応を活性化する役割を担うものであった。これに対し、トマトの *Tm-1* 遺伝子は、過敏反応を誘起することなく、半優性にトマトモザイクウイルス (ToMV) の 1 細胞内での増殖を抑制するユニークなウイルス抵抗性遺伝子である。*Tm-1* 遺伝子は、1940 年代にトマトの近縁野生種 *Solanum habrochaites* から育種的に導入され、トマトモザイク病の被害の軽減に貢献してきたが、染色体上の組み換え頻度の低い領域に座乗していること等の障害によりポジショナルクローニングが成功していない。*Tm-1* による増殖阻害を受けない ToMV 変異株である LT1 株が複製タンパク質コード領域内にアミノ酸置換をもつことから、*Tm-1* は ToMV 複製タンパク質の発現あるいは機能を阻害すると予想された。

本論文は、*Tm-1* 遺伝子を同定するとともに、その ToMV 増殖抑制の分子機構を論じたものである。本論文の内容は以下のように要約される。

脱液胞化したタバコ BY-2 プロトプラストの抽出液 (BYL) を用いることにより、ToMV のゲノム RNA から複製タンパク質を翻訳させ、複製タンパク質によりゲノム RNA が複製される全過程を試験管内で行うことができる。*Tm-1* が ToMV 複製タンパク質に作用して ToMV RNA の複製段階を阻害するとすれば、この系を利用して、*Tm-1* による ToMV RNA の複製阻害活性が試験管内で検出できると期待される。そこで、*Tm-1* 遺伝子を持つトマトより培養細胞ラインを樹立し、この培養細胞から脱液胞化プロトプラスト抽出液を調製した。

BYL を用いた試験管内 ToMV RNA 翻訳複製系に *Tm-1* トマト細胞の脱液胞化プロトプラスト抽出液を加え、野生型 ToMV あるいは LT1 株の RNA をそれぞれ試験管内翻訳複製させたところ、LT1 と比較して野生型 ToMV の RNA 複製が顕著に抑制された。*Tm-1* 遺伝子を持たないトマトの抽出液にはこのような活性は検出されなかったことから、この抑制活性は、*Tm-1* 遺伝子産物に由来するものと考えた。そこで ToMV RNA 複製抑制因子を同定するため、各種クロマトグラフィー等により部分精製し、活性画分に含まれるタンパク質 (p80) を LC-MS/MS 法により同定した。*Tm-1* 遺伝子を持つトマト由来の p80 (p80^{GCR237}) cDNA の塩基配列は、*Tm-1* 遺伝子を持たないトマト由来 p80 (p80^{GCR26}) の配列と異なり、*Tm-1* が由来したとされる野生種トマトのものと同一であった。試験管内翻訳により合成した p80^{GCR237} は、試験管内 ToMV RNA 複製抑制活性を有していたが、p80^{GCR26} は活性を示さなかった。p80 と類似のアミノ酸配列を持つタンパク質は、植物界のみならずカビや細菌にも見出すことができたが、それらはいずれも機能未知の遺伝子であった。

次に、生体内での p80 の ToMV 増殖に対する影響を調べた。*Tm-1* トマトにおいて p80^{GCR237} の発現を抑制したところ、ToMV 抵抗性が打破された。また、p80^{GCR237} を恒常的に発現する形質転換トマトは、野生型 ToMV に抵抗性を示したが、LT1 株の増殖を許容した。さらに、*Tm-1* 遺伝子を持つトマトと持たないトマトとの F2 世代植物において、野生型 ToMV 抵抗性と p80^{GCR237} は共分離した。以上より、p80^{GCR237} が *Tm-1* 遺伝子産物であると結論した。

Tm-1 による ToMV RNA 複製阻害機構の生化学的解析を行った。*Tm-1* により RNA 複製が抑制されたときにも、野生型 ToMV の複製タンパク質は正常に蓄積していることから、*Tm-1* は複製タンパク質の合成あるいは安定性には影響を与えずに、その機能を阻害すると考えられた。試験管内翻訳系を利用した免疫沈降解析では、p80^{GCR237} (*Tm-1*) と野生型 ToMV 複製タンパク質との相互作用が検出されたが、LT1 株の複製タンパク質との相互作用は検出されなかった。p80^{GCR26} と、野生型 ToMV あるいは LT1 複製タンパク質の相互作用は、いずれも検出されなかった。これらの結果より *Tm-1* は野生型 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、LT1 株は *Tm-1* との結合から逃れることによって抵抗性打破能を獲得したと考察した。また、試験管内 ToMV RNA 翻訳複製系において、生体膜成分よりも後に *Tm-1* を加えても阻害活性が検出されないことから、*Tm-1* は生体膜上に既に形成された RNA 複製複合体の機能は阻害できないと推論した。さらに阻害を受けた ToMV 複製タンパク質の解析により、*Tm-1* は複製タンパク質と生体膜の結合は阻害せず、複製複合体の形成過程において生体膜上で起こる状態変化を阻害することを明らかにした。以上の知見より得られた *Tm-1* による ToMV RNA 複製阻害機構のモデルを提示した。

本研究は、植物ウイルスに対する抵抗性を賦与する *Tm-1* 遺伝子を同定するとともに、*Tm-1* の機能を生化学的に明らかにしたものであり、学術的に高く評価できる。よって審査員一同は、石橋和夫が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。