

トウガラシ属植物のトバモウイルス抵抗性遺伝子 *L* の単離と機能解析

愛媛大学農学部 小林 括平・山岡 直人・西口 まさみち
財団法人岩手生物工学研究センター 関 根 健 太郎

はじめに

抵抗性品種の利用は、省力的、経済的かつ環境負荷が小さい等の利点があり、極めて有効な植物病害の防除手段である。直接的に有効な防除薬剤の存在しないウイルス病に対しては、特にその重要性が高い。しかし、多くの抵抗性遺伝子においてこれを打破する病原性変異株が出現し、甚大な被害をもたらす場合もある。そのため、抵抗性打破変異株の生じにくい持続的な抵抗性遺伝子をより多くの作物種において開発することが、農業生産の安定化に向けて非常に重要である。この目的に向けて、抵抗性打破がどのようにして起こるのか、さらにこれを考えるための基礎として、抵抗性遺伝子の病原体に対する特異性がどのように決定されているのかを明らかにしていくことが、植物病理学における基礎研究の役割の一つであろう。本稿では、まず植物のウイルス抵抗性遺伝子のうちの過敏反応を伴う抵抗反応を支配する、いわゆる抵抗性主働遺伝子について概説する。次いで我々が遺伝子クローニングしたトウガラシ属植物トバモウイルス抵抗性遺伝子 *L* について紹介し、最後に今後の抵抗性遺伝子の開発および利用法について議論する。

I 植物のウイルス抵抗性遺伝子

植物のウイルスに対する抵抗性は、以下のようなメカニズムが考えられる (高橋, 2003)。

- (1) ウイルスが最初に侵入した細胞で増殖できない。
- (2) ウイルスが最初に侵入した細胞で増殖した後、隣接した細胞に移行できない。
- (3) ウイルスの増殖・移行がごく少数の細胞に限局され、肉眼的な病徴を示さない。
- (4) ウイルスの増殖・移行はほぼ正常に行われるが、通導組織を介した長距離移行ができない。
- (5) ウイルスの増殖・移行はほぼ正常に行われるが、

病徴が現れない。

(6) ウイルス感染部位の組織が過敏細胞死によって死斑を形成し、ウイルスの増殖・移行が限局される。

これらのうち、(1)~(4)および(5)には劣性および優性の抵抗性遺伝子が知られているが、(6)については優性の抵抗性遺伝子のみが知られている (KANG et al., 2005)。これまでにクローニングされたウイルス抵抗性遺伝子の多くは、単一優性で上記(6)のメカニズムに関与する抵抗性主働遺伝子であり、タバコの *N* 遺伝子やジャガイモの *Rx* 遺伝子等が知られている。それらがコードするタンパク質に共通なドメイン構造としてヌクレオチド結合部位 (NB) およびロイシンリッチリピート (LRR; 20 ~ 30 アミノ酸からなる繰り返し配列で疎水性アミノ酸であるロイシンに富む) があり、NB-LRR 型タンパク質と総称される。NB ドメインの N 末端側にはさらに N 末端ドメインが存在し、タバコの N タンパク質は Toll/Interleukin 1 receptor (TIR) ドメインを、ジャガイモの *Rx* タンパク質は coiled-coil (CC) ドメインを持つ (図-1)。これらのドメインを持つタンパク質は、植物の病害抵抗性遺伝子において主要な二つのファミリーを形成しており、植物種によって異なるが、いずれも多くの遺伝子がゲノム上にコードされている。さまざまな NB-LRR 型抵抗性タンパク質の研究から、LRR ドメインが病原体特異性の決定に関与すること、N 末端領域も病原体認識に関与することが示されている (COLLIER and MOFFETT, 2009)。

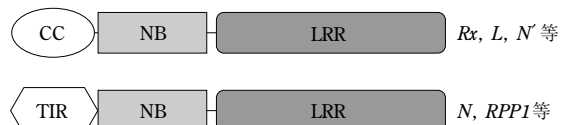


図-1 典型的な植物病害抵抗性タンパク質のドメイン構造
CC, coiled-coil; TIR, Toll/Interleukin 1 receptor; NB, Nucleotide binding; LRR, Leucine-rich repeat. 図の右にそれぞれのドメイン構造を持つ代表的な遺伝子名を示す。

Isolation and Functional Analysis of Tobamovirus Resistance *L* Gene Alleles from *Capsicum* Plants. By Kappei KOBAYASHI, Naoto YAMAOKA, Masamichi NISHIGUCHI and Kentaro SEKINE

(キーワード: *L* 遺伝子, 抵抗性遺伝子, 抵抗性打破, トウガラシ属, トバモウイルス)

II トウガラシ属植物のトバモウイルス 抵抗性遺伝子 *L*

タバコモザイクウイルス (TMV) をタイプ種とするトバモウイルス属には、さまざまな作物の重要病原が含まれ、それらに対する抵抗性遺伝子が古くから利用されてきた。そのうち、タバコの *N* 遺伝子およびトマトの *Tm-2²* 遺伝子については、抵抗性打破変異ウイルス株は存在するが、それらウイルス株では病原性が低下しており、持続的な抵抗性を示している (JANZAC et al., 2009)。一方、ピーマンやトウガラシにおいては古くから *L* 遺伝子が用いられてきたが、これを打破するウイルス株が出現し問題となっている。*L* 遺伝子には複数のアレル (対立遺伝子座) が存在し、*L*¹、*L*² のように番号を付した遺伝子型として区別されてきた。表-1 に示すように *L* 遺伝子は、その番号が大きいほどより多様なトバモウイルスに対して抵抗性を示す。*L*¹ は、TMV やトマトモザイクウイルス (ToMV) 等数種のトバモウイルスに対してのみ抵抗性を示し、この抵抗性遺伝子による抵抗反応を惹起するウイルスを *P*₀ 病原型と呼ぶ。*L*² では、*P*₀ 病原型に加え、*P*₁ 病原型のパプリカ微斑ウイルス (PaMMV) に対しても抵抗性を示し、*L*³ および *L*⁴ では、それらに加えて *P*_{1,2} 病原型のトウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) に対しても抵抗性を示す。*L*³ については、これを打破する変異ウイルス PMMoV *P*_{1,2,3} 病原型が出現しており (TSUDA et al., 1998)、さらにそれに対しても抵抗性を示す *L*⁴ についても抵抗性を打破する PMMoV *P*_{1,2,3,4} 病原型が報告されている (GENDA et al., 2007)。これら抵抗性打破ウイルス株は、*L* 遺伝子産物 (*L* タンパク質) が認識する外被タンパク質 (CP) において、*P*_{1,2} 病原型と比べて 1~2 アミノ酸しか変化しておらず、*L*³ および *L*⁴ の短期間の利用の後に出現した。一方、*P*₀ お

よび *P*₁ 病原型のウイルスではこれまでのところ、少数のアミノ酸変異による抵抗性打破は認められておらず、*L* 遺伝子はそれらのウイルスに対しては持続的な抵抗性遺伝子であると言える。

III *L* 遺伝子の遺伝子クローニング

L 遺伝子では上述のようにトバモウイルスとの間に階層的な関係が成立しており、例えば *L*² タンパク質は *P*₁ 病原型を認識できるが、*P*_{1,2} 病原型を認識できず、しかし *L*³ タンパク質はこれを認識できる。それゆえ、これら抵抗性タンパク質によるトバモウイルス CP 認識機構を比較検討することによって、抵抗性打破、すなわち認識の回避がどのようなメカニズムで起こるのかについての理解が進み、打破されにくい抵抗性遺伝子の開発に結びつくと期待される。そこで我々は、トウガラシ属の *L* 遺伝子のクローニングを行った。

L 遺伝子は、遺伝子マッピングやナス科作物の比較解析の結果から、第 11 番染色体に座乗し、ナス科ゲノムのシンテニー (異種生物において染色体上の遺伝子が同じ順番で並んでいること) からトマトのフザリウム抵抗性遺伝子 *I2* やジャガイモ疫病抵抗性遺伝子 *R3a* との類似性が推定されていた。我が国で栽培されているピーマンやトウガラシが属する *Capsicum annuum* の近縁種である南米原産のトウガラシ、*Capsicum chinense* では、PI159236 など複数の系統が *L*³ 遺伝子を持つことが知られている。それらは、現在、実用に供されている多くの品種に導入されており、また、上述の研究目的からも最も重要なものと位置づけられる。我々は、ピーマン品種間および *C. chinense* PI159236 と *L*² 遺伝子を持つ *Capsicum frutescens* LS 1839-2-4 の種間雑種 F2 を用い、*L*³ 遺伝子と連鎖する遺伝子マーカーを開発して *L*³ 遺伝子のマッピングを行った。また、平行して、それら

表-1 *L* 遺伝子の反応に基づくトバモウイルスの病原型分類

抵抗性 遺伝子	トバモウイルス					
	TMV (<i>P</i> ₀)	ToMV (<i>P</i> ₀)	PaMMV (<i>P</i> ₁)	PMMoV (<i>P</i> _{1,2})	PMMoV (<i>P</i> _{1,2,3})	PMMoV (<i>P</i> _{1,2,3,4})
<i>L</i> ⁺	S	S	S	S	S	S
<i>L</i> ¹	R	R	S	S	S	S
<i>L</i> ²	R	R	R	S	S	S
<i>L</i> ³	R	R	R	R	S	S
<i>L</i> ⁴	R	R	R	R	R	S
<i>N</i>	S	R	R	R	R	R

L⁺: トウガラシ属トバモウイルス感受性 *L* 遺伝子アレル, S: 感受性, R: 抵抗性. 括弧内は *L* 遺伝子型の反応によって分類された病原型を示す.

のマーカーを用いて *C. chinense* PI159236 のゲノムライブラリーをスクリーニングし、*L*³ 遺伝子領域に該当するゲノムクローンを整列化した。そして、*L*³ 遺伝子が第 11 番染色体末端付近の約 400 kbp の領域に存在し、この領域にはトマトの *I2* 遺伝子やジャガイモ *R3a* 遺伝子に相同な配列が多数存在することを明らかにした (Tomita et al., 2008)。この領域の約 90% に相当するゲノムクローン 5 個が *L*³ 遺伝子を含むと考えられたのでそ

れらの塩基配列を解析し、その *L*³ 遺伝子がマッピングされた領域内に一つだけ CC-NB-LRR 型の典型的な抵抗性タンパク質をコードする遺伝子を見いだした。この *L*³ 候補遺伝子のコード領域をシロイヌナズナ由来アクチンプロモーターの下流に挿入し、*Nicotiana benthamiana* における一過性発現系を用いてその機能を解析した。候補遺伝子は単独発現では何ら反応を起こさなかったが、PMMoV (P_{1,2}) の CP と共発現させた場合には、過敏反応を誘導した。さらに種々のトバモウイルス CP との共発現実験から、この候補遺伝子が *L*³ 遺伝子を持つ *C. chinense* 植物における反応を再現することが示され (図-2)、本遺伝子が *L*³ 遺伝子そのものであると考えられた (Tomita et al., 2011)。

さらに本遺伝子の相同配列を種々の *L* 遺伝子を持つトウガラシ属植物から PCR で増幅後クローニングし、同様の機能解析を行った。その結果、*L*¹、*L*² および *L*⁴ に加え、*L*² と同様の機能を持つ *Capsicum baccatum* 由来の *L*^{2b}、*L*¹ と同様の機能を持つ *Capsicum chinense* 由来の *L*^{1c} および *Capsicum annuum* 由来の *L*^{1a} (Sawada et al., 2004) の合計 7 種の *L* 遺伝子について、それらが由来するトウガラシ属植物における反応を一過性発現系において再現することが示された (表-2; Tomita et al., 2011)。*L*^{1a} は P₁ 病原型に対して弱い HR 誘導能を示したが、この遺伝子を持つトウガラシ属植物では P₁ 感染時に全身え疽を示すことが報告されており、矛盾のない結果と考えられる。P₀ 病原型に対しても感受性のトウガラシ属植物からは、*L*³ 遺伝子の相同配列を増幅することができなかった。少なくとも我々が解析したトバモウイルス感受性植物では、*L* 遺伝子が完全に失われてい

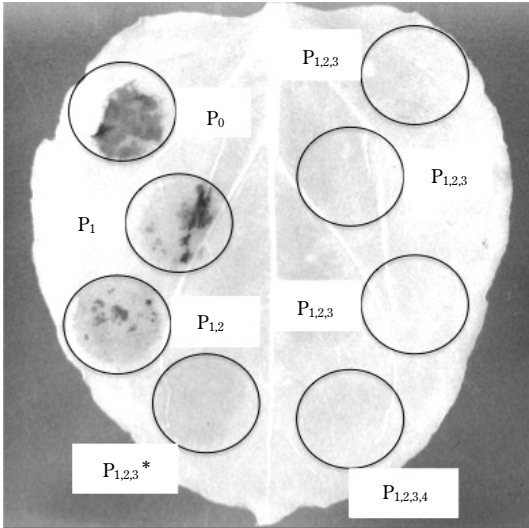


図-2 *L*³ 遺伝子の一過性発現系における機能解析
それぞれ、*L*³ 遺伝子と表示した病原型のトバモウイルス CP を *N. benthamiana* において一過性発現させ、5 日後に葉をエタノールで脱色して観察した。P_{1,2,3}* は、全身え疽を誘導する不完全抵抗性打破 PMMoV 株由来の CP を示す。

表-2 種々のトウガラシ属植物から得られた *L* 遺伝子アレルの機能

アレル名	植物種	HR 誘導能 ^ア				
		P ₀	P ₁	P _{1,2}	P _{1,2,3}	P _{1,2,3,4}
<i>L</i> ¹	<i>Capsicum annuum</i>	+ ^イ	- ^ウ	-	-	-
<i>L</i> ^{1a}	<i>Capsicum annuum</i>	+	± ^エ	-	-	-
<i>L</i> ^{1c}	<i>Capsicum chinense</i>	+	-	-	-	-
<i>L</i> ²	<i>Capsicum frutescens</i>	+	+	-	-	-
<i>L</i> ^{2b}	<i>Capsicum baccatum</i>	+	+	-	-	-
<i>L</i> ³	<i>Capsicum chinense</i>	+	+	+	-	-
<i>L</i> ⁴	<i>Capsicum chacoens</i>	+	+	+	+	-

^ア: *Nicotiana benthamiana* における一過性発現において各病原型 CP と共発現したときに HR 細胞死を誘導する能力。イ: HR 誘導能あり。ウ: HR 誘導能なし。エ: 弱い HR 誘導能を持つ。

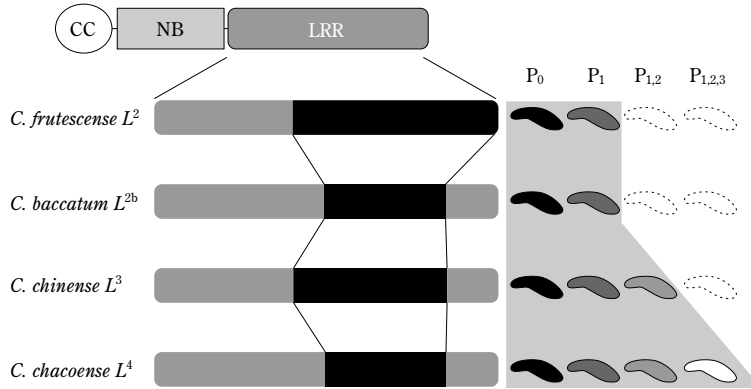


図-3 Lタンパク質のトバモウイルス CP 認識範囲を決定している領域
 抵抗性タンパク質の模式図(左上)のLRRを各遺伝子型について拡大して示す。それぞれの遺伝子型の認識範囲に必要な領域を黒で示す。右はそれぞれの遺伝子型の認識範囲を模式的に示す。網がけの領域が認識されるCPであり、点線で示したものは認識されない。

る可能性が考えられる。

IV Lタンパク質によるトバモウイルス CP 認識範囲の決定機構

これまでにクローニングされた様々な植物病害抵抗性遺伝子において、LRRが認識特異性の決定に重要であることが指摘されている。我々は、クローニングしたトウガラシ属 *L* 遺伝子アレルを用いて種々のキメラを作製し、Lタンパク質が認識できるトバモウイルス CP の範囲を規定している領域が、やはり LRR であることを明らかにした(図-3)。

Lタンパク質の認識範囲決定領域の解析は、最も認識範囲の狭い L^1 と認識範囲の広い L^2 , L^{2b} , L^3 および L^4 とのキメラタンパク質を数種類ずつ作製し、それぞれの認識範囲を比較して行った。キメラタンパク質にもとの広い認識範囲を付与するのに必要な領域は、 L^{2b} および L^4 では LRR の中央領域のみであったのに対し、 L^2 および L^3 ではさらに広い領域が必要であった(図-3)。すなわち、LRR の異なる部分領域が認識範囲の決定に関与しており、各 Lタンパク質の LRR 部分領域のトバモウイルス CP 認識における貢献度も異なるものと考えられた。LRR ドメインの反復単位は、 $xxLxLxx$ (L , ロイシン; x , 任意のアミノ酸) の配列からなっており、 x で示される座位は溶媒に露出した残基でタンパク質間相互作用に重要と考えられている。しかし、Lタンパク質のキメラ解析によって認識範囲の決定に関与すると考えられたアミノ酸残基には、上述の x の位置に該当しないものもいくつかあり、LRR ドメイン中の複数のアミ

ノ酸がトバモウイルス CP と相互作用し、その親和性の総和が認識の成否を決定していると考えられる。

V より持続的な抵抗性の開発に向けて

L 遺伝子には既に打破株が存在し、その防除効果は限定的と言わざるを得ない。生産現場からは当然のニーズとして、より持続的な抵抗性が求められる。上述のように Lタンパク質によるトバモウイルス CP 認識機構の研究は、まだ端緒についたばかりであり、その機能改変による持続的抵抗性の開発には、残念ながらまだ時間がかかるだろう。また、新規の抵抗性遺伝子の探索も容易ではない。そこで重要と思われるのは、既存の抵抗性遺伝資源を有効に活用することである。

これまで L^3 打破株が発生した場合、クローニングクロープとして L^4 遺伝子が用いられてきたが、その L^4 遺伝子においても抵抗性打破株が発生しており、最上位のトバモウイルス病原型 ($P_{1,2,3,4}$) に対して有効な *L* 遺伝子はない。しかし、表-1 に示したように、*L* 遺伝子と同様にトバモウイルスの CP を認識する *Nicotiana sylvestris* の N' 遺伝子は、 P_0 病原型のウイルスである TMV に対しては抵抗性を示さないが、他のトバモウイルスに対しては広く抵抗性を示す (CULVER, 2002)。我々はこの N' 遺伝子もクローニングし、これが PMMoV $P_{1,2,3,4}$ 病原型に対して抵抗性を示すことを明らかにした(投稿準備中)。イネいもち病でよく研究されているマルチラインのように、 N' 遺伝子を *L* 遺伝子と組合せて用いることによって持続的な防除が可能になるのではないだろうか。その場合に特に注目すべきは L^{1a} 遺伝子であ

る。*L*^{1a} はその他の *L* 遺伝子と異なり、30℃の高温でも P₀ 病原型に対して安定した抵抗性を示す (SAWADA et al., 2004) ことから、P₀ 病原型の TMV に対してのみ抵抗性を示さない *N'* 遺伝子と組合せるには最良であろう。ただし、*N. sylvestris* には商品価値はないと考えられるので、それらの植物をどのように組合せるのが今後の課題であろう。

おわりに

本稿では我々がクローニングした *L* 遺伝子の機能について紹介するとともに、持続的な抵抗性に向けての *L* 遺伝子の活用法についても考えるところを述べさせていただいた。この活用法に関する研究についてはまだ着手

したばかりであり、今後の進め方について読者諸賢のご指導・ご助言をいただければ幸甚である。

引用文献

- 1) COLLIER, S. M. and P. MOFFETT (2009): Trends Plant Sci. 14: 521 ~ 529.
- 2) CULVER, J. N. (2002): Annu. Rev. Phytopathol. 40: 287 ~ 308.
- 3) GENDA, Y. et al. (2007): Phytopathology 97: 787 ~ 793.
- 4) JANZAC, B. et al. (2009): Mol. Plant Pathol. 10: 599 ~ 610.
- 5) KANG, B.-C. et al. (2005): Ann. Rev. Phytopathol. 43: 581 ~ 621.
- 6) SAWADA, H. et al. (2004): J. Japan Soc. Hort. Sci. 73: 552 ~ 557.
- 7) 高橋英樹 (2003): 新版 分子レベルから見た植物の耐病性・ポストゲノム時代の植物免疫研究, 秀潤社, 東京, p. 182 ~ 193.
- 8) TOMITA, R. et al. (2008): Theor. Appl. Genet. 117: 1107 ~ 1118.
- 9) _____ et al. (2011): Mol. Plant-Microbe Interact. 24: 108 ~ 117.
- 10) TSUDA, S. et al. (1998): ibid. 11: 327 ~ 331.

植物防疫特別増刊号 No.13

フェロモンによる発生予察法

新刊

B5判 168ページ
定価 3,150円 (税込)
(送料80円:メール便)

◆フェロモン等誘引物質を用いた発生予察法について
34害虫を網羅し、各研究者が詳しく解説しています。



[掲載内容]

ニカメイガ, コブノメイガ, アワノメイガ, アカヒゲホソミドリカスミカメ, フタオビコヤガ, ハスモンヨトウ, シロイチモジヨトウ, ヨトウガ, オオタバコガ, タバコガ, ネキリムシ類 (カブラヤガ, タマナヤガ), タマナギンウワバ, コナガ, ネギコガ, アリモドキゾウムシ, マメコガネ, ヒメコガネ, チャドクガ, リンゴコカクモンハマキ, リンゴモンハマキ, モモシンクイガ, ナシヒメシンクイ, モモゴマダラノメイガ, コスカシバ, モモハモグリガ, キンモンホソガ, チャバネアオカメムシ, スモヒメシンクイ, クビアカスカシバ, ナシマルカイガラムシ, アカマルカイガラムシ, チャノコカクモンハマキ, チャハマキ, チャノホソガ

お問い合わせは下記へ。

〒114-0015 東京都北区中里 2-28-10

TEL 03-5980-2183 FAX 03-5980-6753

<http://www.jpapa.or.jp/> order@jpapa.or.jp