

## トマトのウイルス抵抗性遺伝子を打ち破る ウイルス変異株の打破メカニズムの予測に成功

### 【発表のポイント】

- ・ トマトモザイクウイルス (tomato mosaic virus: ToMV) はトマトに感染し、甚大な被害を与えます。この ToMV に対する抵抗性品種が開発され、中でも Tm-2<sup>2</sup> 遺伝子を有する抵抗性品種は最も強力なため、半世紀以上にわたって世界中で広く利用されてきました。
- ・ しかし最近、世界各地でこの抵抗性を打破する変異株の発生が報告され、日本でも 2011 年から栃木県をはじめ各地で打破系統が見つかっています。
- ・ そこで、我々は熊本県で発生したウイルスを用いて、抵抗性打破に關与するウイルス遺伝子を特定し、打破の仕組みを予測することに成功しました。

### ■研究概要

宇都宮大学農学部の西川尚志准教授、煉谷裕太郎助教、夏秋知英特命教授を中心とする植物病理学研究室と熊本県農業研究センターのグループは、熊本県で発生したトマトの Tm-2<sup>2</sup> 抵抗性遺伝子を打ち破るトマトモザイクウイルス (tomato mosaic virus: ToMV) の変異株 (熊本株) を用いて、その抵抗性打破の仕組みを遺伝子レベルで解析しました。その結果、ウイルスが植物体内を移動するために必須の移行タンパク質 (MP) (注1) で、240 番目のアミノ酸がアスパラギン酸からチロシンに変異することが抵抗性打破を引き起こしていました。さらに、MP と Tm-2<sup>2</sup> 抵抗性遺伝子の二つのタンパク質の立体構造と相互作用で、熊本株の変異した MP が Tm-2<sup>2</sup> 抵抗性タンパク質の影響を受けないことで抵抗性を打破すると予測されました。本研究成果は、トマトの新たな抵抗性品種の作出のための基礎的知見として貢献することが期待できます。

本研究成果は、6月21日、国際学術誌「Virus Genes」に掲載されました (オンライン版)。

## ■研究の背景

トマトモザイクウイルス (tomato mosaic virus: ToMV) はトマトに感染し、甚大な被害を与えます。また、感染したトマトの葉を触ったり、水やりの水に乗って周りのトマトに感染するので、農作業などにより気づかないうちに被害が広がります。さらに、土の中に長期にわたって存在するので防除が非常に困難です。

そのため、抵抗性遺伝子として、Tm-1, Tm-2, Tm-2<sup>2</sup> などを持たせた品種が開発されていますが、中でも Tm-2<sup>2</sup> 遺伝子は最も強力なため、半世紀以上にわたって世界中の多くの品種で利用されてきました。

しかし最近、世界各地で Tm-2<sup>2</sup> 遺伝子の抵抗性を打破する ToMV 変異株の発生が報告され、日本でも 2011 年に栃木県で確認されてから、福岡県、広島県、岐阜県、茨城県等で相次いで報告され、その発生が拡大しています。これまでの報告から、Tm-2<sup>2</sup> 遺伝子の抵抗性の打破にはウイルスの移行タンパク質 (MP) (注 1) が原因であり、そのタンパク質の突然変異により抵抗性を打破すると予想されていましたが、打破のメカニズムの詳細は不明でした。また、発生する地域によりウイルスの変異個所も異なることから、打破系統のウイルスが世界各地に広がったのではなく、ウイルスが各地で独自に突然変異を起こしていると考えられています。

そこで我々は、熊本県で発生した変異株 (図 1) を用いて、抵抗性打破のメカニズムを明らかにすべく、遺伝子レベルの解析を行いました。



(図 1) 熊本県八代市のハウスで見つかった、Tm-2<sup>2</sup> 遺伝子を持つトマトのウイルス病の症状。葉や実の細胞が壊死し、実は大きくなならない。

## ■研究方法

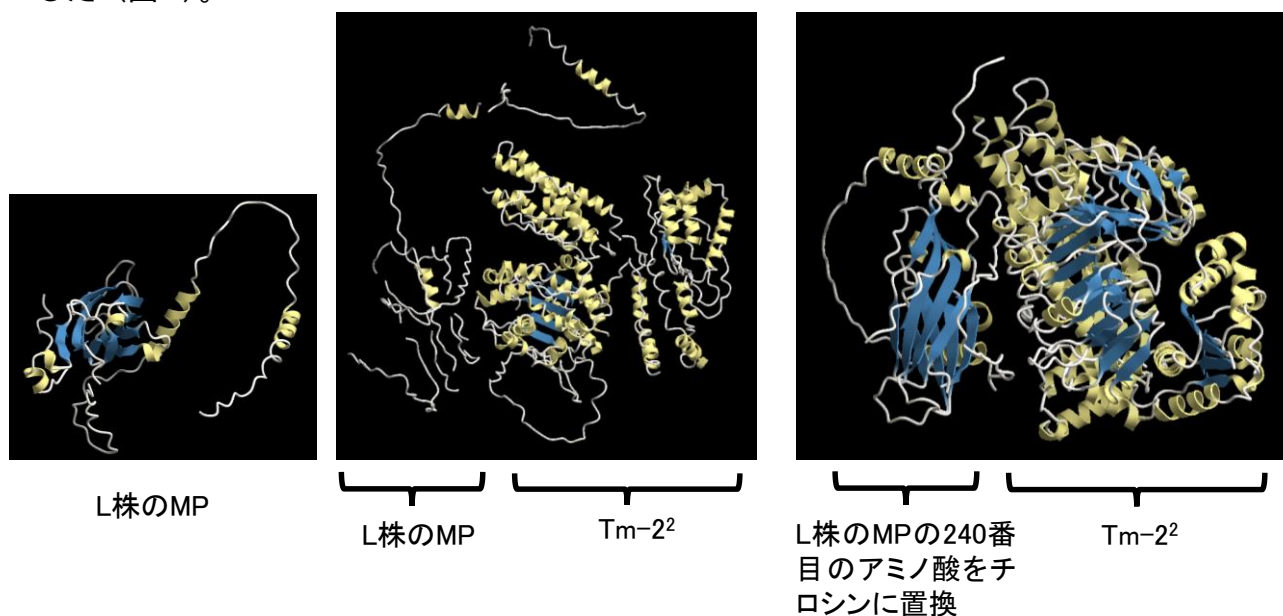
熊本県で発生した変異株 (以降「熊本株」とする) のウイルスの全塩基配列を決定し、抵抗性を打破しない旧来のウイルス (L 株) と比較することで、抵抗性打破に関与する可能性のあるアミノ酸を予測しました。次に、L 株と熊本株の間で遺伝子を組換えた各種キメラウイルス (注 2) を作製し、トマト苗への接種試験を行いました。さらに、特に MP において L 株と熊本株で異なるアミノ酸に着目し、それらのアミノ酸だけを変えた点変異株 (注 3) を作製し、トマト苗への接種試験を行うことで、抵抗性打破に関与するアミノ酸を特定しました。

## ■研究成果

L 株と熊本株の間には全部で 9 か所のアミノ酸の変異があり、これらのうちのどれかが抵抗性打破に関与する可能性が考えられました。各種キメラウイルスの接種試験の結果、やはり MP が原因であることが分かりました。L 株と比較すると、熊本株の MP は 224 番目

と 240 番目のアミノ酸がそれぞれアスパラギン → セリン、アスパラギン酸 → チロシンに置換していました。そこで、1 か所のアミノ酸だけ異なる各種変異ウイルスを作製し接種試験を行ったところ、240 番目が熊本株と同じチロシンであれば Tm-2<sup>2</sup> 遺伝子の抵抗性を打破することが明らかとなりました。

さらに、MP と Tm-2<sup>2</sup> の二つのタンパク質の立体構造と相互作用を予測（注 4）した結果、L 株の MP は Tm-2<sup>2</sup> により立体構造が崩れて機能を失いますが、熊本株の MP は安定しており、結果として MP の機能を失わないことで抵抗性を打破する、という可能性が考えられました（図 2）。



（図 2）立体構造予測の解析の一例

L 株の MP（左）が Tm-2<sup>2</sup> が相互作用する場合、MP の構造は崩れてしまい、青色で示されたβシート構造が消失するが（中央）、MP の 240 番目のアミノ酸をチロシンにすると立体構造は崩れないことが分かる（右）

#### ■今後の展望（研究のインパクトや波及効果など）

これまで Tm-2<sup>2</sup> 遺伝子の抵抗性の打破はウイルスの MP タンパク質のアミノ酸変異が原因であることは予想されていましたが、発生地によりアミノ酸変異の部位が異なることから、抵抗性打破のメカニズムの詳細は不明のままです。本研究により、熊本株の抵抗性打破は、Tm-2<sup>2</sup> 抵抗性タンパク質に影響されない、安定した変異 MP タンパク質が作られたことが示されたことで、この研究分野に大きな一石を投じることになったと思います。今後は、他の地域の変異株が同じメカニズムにより抵抗性を打破するのかを調べ、変異株にも抵抗性を示す新たな品種を開発する必要があると思います。

#### ■論文情報

論文名：Characterization of a ToMV isolate overcoming *Tm-2<sup>2</sup>* resistance gene in tomato

雑誌名：Virus Genes

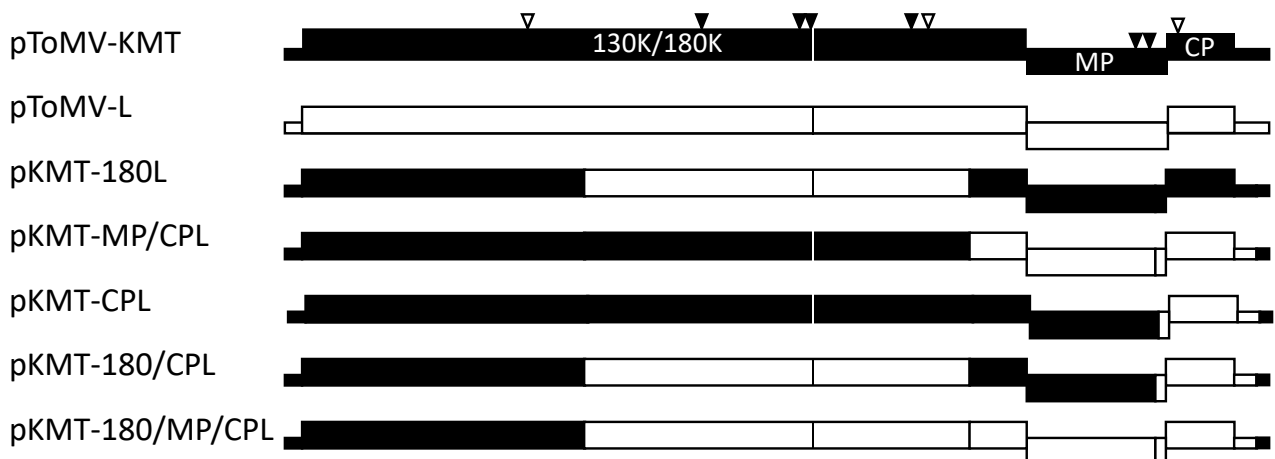
著者：Misato Kuroiwa, Syoya Handa, Yutaka Gyoutoku, Miho Moriyama, Yutaro Neriya, Hisashi Nishigawa and Tomohide Natsuaki

URL: <https://doi.org/10.1007/s11262-022-01921-9>

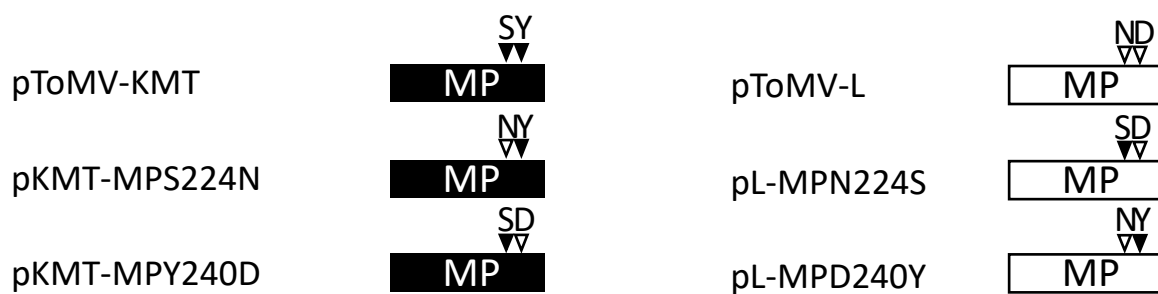
## ■用語説明

注1 移行タンパク質 (movement protein) はウイルスが作るタンパク質の1つで、植物体内で隣の細胞へと移動するときに使われます。略して MP と表記されます。

注2 キメラウイルスとは 2 種類のウイルスのゲノムを持つウイルスのことです。例えば下図のように、熊本株のゲノム (1 番上) を黒で、L 株 (2 番目) を白で表した場合、3 つ目以降はすべて熊本株と L 株のゲノムが混ざったキメラウイルスとなります。これらを植物に接種し、抵抗性打破の有無を調べることで、ゲノムのどの領域が抵抗性に関与するのか特定することができます。三角形が熊本株と L 株で違いのあるアミノ酸の場所で、そのうち白い三角形は類似アミノ酸を示しています。MP には 2 か所 (224 番目と 240 番目) に違いがあります。130K/180K は複製に関与するタンパク質、CP はウイルス粒子を形作る外被タンパク質です。



注3 点変異株とは、1つのアミノ酸だけを変えたウイルスのことです。下図のように、熊本株の MP は 224 番目がセリン (S)、240 番目がチロシン (Y) ですが、例えば、224 番目だけを L 株と同じアスパラギン (N) に変えた点変異株が pKMT-MPS224N です。なお図では MP 以外の領域は省略しています。これらの点変異株を使って接種試験を行うことで、変えたアミノ酸が抵抗性打破に関与しているかどうか確かめることができます。



注4 本研究では MP と Tm-2<sup>2</sup> の相互作用 (結合の解析) を最近開発された AlphaFold2 予測プログラムを使って調べました。

## ■英文概要

Tomato mosaic virus (ToMV) is easily transmitted in soil and by contact. By these reasons, it is relatively difficult to control ToMV disease in tomato. Incorporation of the *Tm-2* gene has been widely used as a control method for ToMV, but ToMV isolates that overcome this resistance gene have been reported worldwide in recent years. In this study, we determined the entire nucleotide sequences of ToMV isolate [named ToMV-KMT (LC650928)], which was isolated from tomato plants showing symptoms of systemic necrosis in Kumamoto prefecture, Japan. We also analyzed the viral gene of ToMV-KMT that overcome the *Tm-2* gene by constructing its infectious cDNA clone and by generating chimeric viruses with a non-breaking strain. According to previous research, *Tm-2* recognizes the viral movement protein (MP) and exerts resistance by inducing hypersensitive reaction or hypersensitive cell death. We discovered that a mutation in the 240th amino acid (aspartic acid to tyrosine) of the MP of ToMV-KMT, which may stabilize the protein's structure, is responsible for the ability of this isolate to overcome the resistance of *Tm-2*.

### 本件に関する問い合わせ

(研究内容について)

国立大学法人 宇都宮大学 学術院 准教授 西川 尚志

TEL : 028-649-5449 FAX : 028-649-5449 E-mail : [nishigawa@cc.utsunomiya-u.ac.jp](mailto:nishigawa@cc.utsunomiya-u.ac.jp)

(報道対応)

国立大学法人 宇都宮大学 広報室 (広報係)

TEL : 028-649-5201 FAX : 028-649-5026 E-mail : [kkouhou@miya.jm.utsunomiya-u.ac.jp](mailto:kkouhou@miya.jm.utsunomiya-u.ac.jp)