

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：81202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780043

研究課題名(和文)植物のトバモウイルス認識機構における宿主-ウイルスタンパク質間相互作用の解析

研究課題名(英文) Analysis of the interaction between host and virus proteins in plant resistance to tobamovirus.

研究代表者

関根 健太郎 (Sekine, Ken-Taro)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・生命科学研究部・主任研究員

研究者番号：30574058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：トウガラシ属植物のトバモウイルス抵抗性の分子機構解明を目指し、抵抗性の特異性を決定する抵抗性タンパク質L1,L2,L3およびL4とそれらに認識されるトバモウイルス外被タンパク質の変異導入による機能解析に取り組んだ。Lと外被タンパク質は物理的に相互作用し、その親和性の強度が、認識特異性と抵抗反応強度を決定することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The allelic L proteins, L1, L2, L3, and L4, showed increasing binding capacity to different tobamovirus CPs, suggesting the correlation between the binding affinity and CP recognition by L proteins. In this study, we performed mutational analysis on xxLxLxx beta-sheet motifs in Leucine-rich repeat of L4 protein and CP responsible for the recognition. The binding affinity between L and CP (or the stability of the complex containing these proteins) is important for generating resistance signals.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード：植物 ウイルス 抵抗性タンパク質 相互作用 構造生物学

1. 研究開始当初の背景

植物が持つ多様な病害抵抗性の中で、抵抗性タンパク質 (R タンパク質) に制御される抵抗性反応は、最も強力な防御応答であり、その分子機構の理解は、植物の免疫力を人為的に制御する新たな防除技術の開発を可能にする。ここ数十年で、国内外において植物の抵抗性遺伝子が多数単離され、機能解析が精力的に進められ、競争の激しい分野である。近年は、R タンパク質とこれに認識される非病原力エフェクター (Avr) の両タンパク質に相互作用する因子 (コファクター) が同定され、コファクターを介した Avr 認識機構の仮説が提唱されている【Moffett (2009) Adv. Virus Res. 75:1-33】。しかし、認識機構における R-Avr タンパク質間相互作用をタンパク質の立体構造レベルで説明したモデルはない。

これまで、トバモウイルス抵抗性遺伝子としてトウガラシ属植物より 4 種類の L 遺伝子と【Tomita *et al.* (2011) Mol. Plant-Microbe Interact. 24:108-117】タバコより N' 遺伝子を単離した (Sekine *et al.*, 2012)。これらトバモウイルス抵抗性遺伝子群は対立遺伝子又はホモログの関係にあり、単独で数種のトバモウイルス外被タンパク質 (CP) を認識できることと、各抵抗性遺伝子の認識できるトバモウイルスの範囲が重複しつつ異なるという特徴を持つ。このような特徴から、トバモウイルス抵抗性遺伝子群は、認識機構を解明する上で非常に有効な材料である。例えば、申請者は以前、シロイヌナズナの対立遺伝子関係にある cucumber mosaic virus 抵抗性遺伝子 *RCY1* と、turnip crinkle virus 抵抗性遺伝子 *HRT* を用いて、認識特異性決定領域を探索したが、相同性が 90%程度であり、両遺伝子間でドメインスワップをすると機能が失われるなど解析が難航した。一方、L タンパク質間の相同性は 99%以上あり、機能を損なうことなくドメインスワップが可能

であった。また、認識する Avr も同一である為、シンプルに R タンパク質間の比較ができる。このような他にない材料の利点を最大限に生かせば、世界に先駆けて R タンパク質による Avr 認識機構を解明できる。

既に、L タンパク質間及び、L³と N' 間でのドメインスワップによりロイシンリッチリピート (LRR) が、抵抗性の認識特異性を決定することを明らかにした。さらに L^{2b} タンパク質の 1127 番目のアミノ酸を L⁴型に換えると認識範囲が広がることから、1) 一アミノ酸置換で認識範囲が変わりうること、また、L³において C 末を 5 残基削ると PMMoV を、10 残基削ると PaMMV と TMV を、15 残基削ると ToMV を認識できなくなることから、2) 認識に必要な分子内領域が各 Avr によって異なることがわかった。抵抗性遺伝子に変異を加えると、認識ができなくなるような loss of function mutants が得られるが、この場合機能が失われた原因がアミノ酸置換自体にあるのか、立体構造の変化によるものなのかという疑問が生まれる。しかし、L タンパク質の場合は Avr が複数存在する為に、3) 認識範囲が広がる gain of function mutants や、認識範囲の狭まる less of function mutants が得られるため、アミノ酸置換自体の影響をより明確に知ることができる。また、4) LRR ドメインは、結晶構造が解かれている動物の自然免疫に機能する Toll like receptor 3 タンパク質を元に立体構造予測ができる。一方で、5) TMV の CP は既に立体構造が分かっている。さらに、免疫共沈法により、6) L と CP が *in vivo* で複合体を形成しており、抵抗性を誘導する場合に、相互作用が強い傾向があることを明らかにしていた。以上の下線 1)から 6)より、L タンパク質の変異導入により、R-Avr タンパク質間相互作用のアフィニティが認識特異性及び抵抗性強度と相関性を持つことを検証しようとして着想した。

2. 研究の目的

R-Avr タンパク質間相互作用のアフィニティが、認識特異性及び抵抗性強度と相関性を持つことを検証する (Fig. 1). さらに、R 及び Avr タンパク質各々の、相互作用のアフィニティを決定する部位又は領域を明らかにするとともに、立体構造のドッキングモデルの構築を目指す。

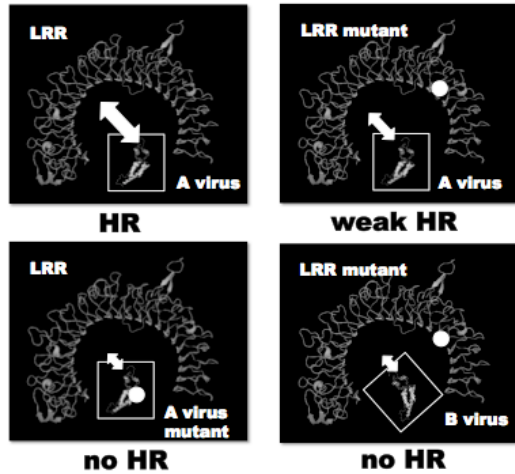


Fig. 1 R-Avr 間相互作用のアフィニティと、抵抗性の強度が相関性を持つ場合の予想図。(両矢印の太さ、長さがアフィニティの大きさ)

3. 研究の方法

1) L^4 変異タンパク質シリーズの作製と一過性発現によるウイルス CP 認識能の検定

変異の導入は、タンパク質間相互作用に関わる β シートモチーフ (xxLxLxx) の L 間のドメインスワップ又は xALALAx へのアミノ酸置換を行った。ベンサミアーナタバコ葉を用いて、アグロバクテリウムにより変異 L と CP を共発現させ、細胞死誘導能を調べる実験系で、ウイルス CP 認識能を検定する (Fig. 2)。

2) 免疫共沈法による L-CP 相互作用解析

L に HA タグ、CP に Myc タグを付加しており、これらの抗体を用いた免疫共沈法により、L-CP 間の相互作用を検出する (Fig. 2)。

3) 認識特異性の変化する CP 変異体の探索

CP の L による被認識部位を探索するために、1 ないし 2 アミノ酸の違いで L による認識を

回避することが知られている *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) の CP にランダム変異を導入することで、 L^3 , L^4 , N' の認識を回避する変異体を探索した。さらに、PMMoV を認識できない L^2 に対して、認識されるようになる gain of function 変異体の探索も同時に行った。

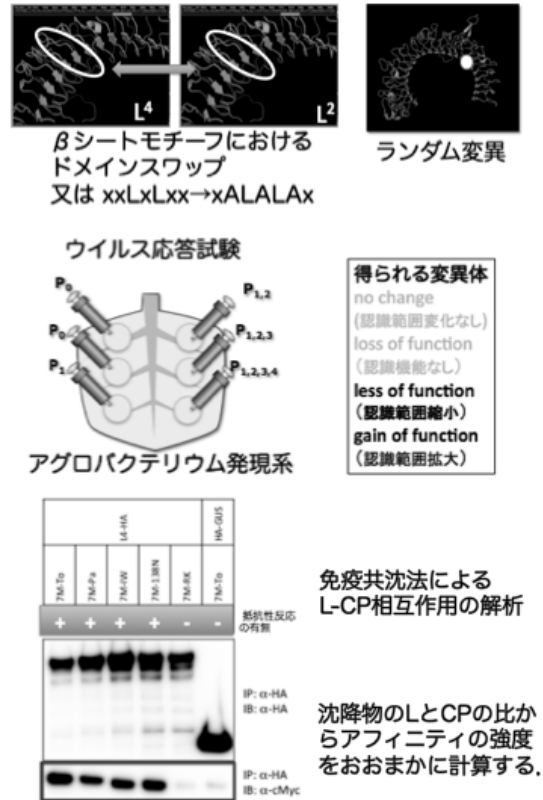


Fig. 2 実験の流れ

4. 研究成果

植物の宿主特異的抵抗性における抵抗性タンパク質 (R) による病原体非病原力エフェクター (Avr) の認識機構を分子レベルで理解する為、トウガラシ属の L タンパク質ファミリーと、これらに認識されるトバモウイルスの外被タンパク質 (CP) をモデル実験系として、認識特異性及び抵抗性反応強度と R-Avr タンパク質間相互作用のアフィニティの相関性について検証した。はじめに、認識可能な CP の範囲が最も広いとされる L^4 について、認識範囲が狭小化する変異体を得た。認識特異性を決定している

LRR ドメインの 32 個の推定 β シートモチーフ配列 xxLxLxx を個々に xALALAx とアミノ酸置換を導入し、それぞれの変異体の CP 認識能を検証した。様々に認識範囲の狭小化が認められたが、モチーフ特異的にある種の CP が認識されなくなるのではなく、必ず認識されにくい CP から順に認識されなくなるという傾向が認められた (Fig. 3).

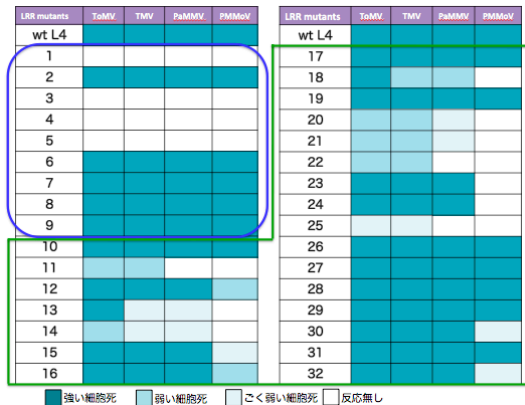


Fig. 3 LRR の β シートモチーフ変異体の各ウイルスに対する応答

12 番目のモチーフと 32 番目のモチーフの xALALAx 変異体 (L^4 LRR12A 及び L^4 LRR32A) は、共に、認識範囲の狭小化が認められ、さらに最も認識されやすい CP (ToMV-CP) に対する抵抗性反応強度が弱まっていた。この 2 つの変異を持つ二重変異体 (L^4 LRR12A32A) は、さらに認識範囲が狭くなり、かつ ToMV-CP に対する抵抗性反応強度が弱まっていた。すなわち認識範囲と抵抗性反応強度は、[wild type L^4 > L^4 LRR12A= L^4 LRR32A > L^4 LRR12A32A] となった。これらの R タンパク質と ToMV-CP の相互作用を免疫共沈法で検証すると、どれも相互作用が認められ、そのアフィニティは、[wild type L^4 > L^4 LRR12A= L^4 LRR32A > L^4 LRR12A32A] であり、正の相関が認められた (Fig. 4)。このことから、認識特異性並びに抵抗性反応強度と L-CP タンパク質間相互作用のアフィニティに正の相関性があることを明らかにした。相互作用の親和性に

は複数の LRR モチーフが相加的に寄与しているものと考えられた (Fig. 4)。

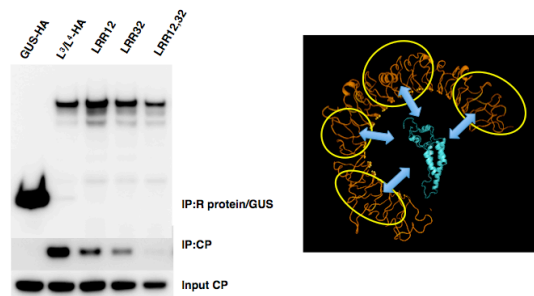


Fig. 4 LRR12A と LRR32A の相加的な相互作用親和性への影響 (左) と、想定される相互作用のイメージ図 (右)

さらに CP 側の被認識部位の特定を目指し、 L^1 及び L^2 に認識されず、 L^3 及び L^4 に認識されるトウガラシ微斑ウイルス岩手系統 (PMMoV-Iw) の CP 遺伝子配列にランダムに点変異を導入することによって、L タンパク質による被認識アミノ酸残基又は部位を探索した。はじめに L^3 又は L^4 に認識されなくなる変異体を選抜した結果、 L^3 または L^4 の認識に必要な CP 上のアミノ酸部位が異なることが明らかになった。さらに L^2 に認識されるようになる変異体を選抜したところ、150 系統のうち 15 系統得られた。得られた変異体のアミノ酸変異部位は多様であり、立体構造上の部位は一部に集約されず全体に分散した。すなわち、L による CP 認識の標的部位は、特定の部位ではなく、複数の部位がターゲットとなりうると考えられた。

上述のように、L タンパク質 LRR ドメイン内の複数の部位とトバモウウイルスの CP 内の複数の部位が相互作用の親和性を決定している可能性が示された。相互作用の場が各タンパク質の一カ所対一カ所でないことから、ドッキングモデルの構築は困難であると示唆された。しかし、これまで数アミノ酸の違いで認識の有無が変化する L 及び CP の変異体を多数得ることができた。こ

れらアミノ酸置換による認識特異性の変化、相互作用の親和性への影響の原因を個々に明らかにしていくことで、植物のウイルス認識に関わるタンパク質間相互作用の分子モデル構築の一助となる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

Sekine, K.-T., Tomita, R., Takeuchi, S., Atsumi, G., Saitoh, H., Mizumoto, H., Kiba, A., Yamaoka, N., Nishiguchi, M., Hikichi, Y., and Kobayashi, K. Functional differentiation in the LRR domains of closely related plant virus resistance proteins that recognize common Avr proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25:1219-1229.

Mizumoto, H., Nakamura, I., Shimomoto, Y., Sawada, H., Tomita, R., Sekine, K.-T., Kiba, A., Nishiguchi, M., Kobayashi, K., and Hikichi, Y. Amino acids in *Tobamovirus* coat protein controlling pepper *L^{1a}* gene-mediated resistance. *Molecular Plant Pathology* 13:915-922

Kobayashi, K., Sekine, K.-T., Nishiguchi, M. Breakdown of plant virus resistance: can we predict and extend durability of virus resistance? *Journal of General Plant Pathology* 印刷中. DOI 10.1007/s10327-014-0527-1

[学会発表] (計3件)

関根健太郎・富田麗子・厚見剛・小林括平, Avr 機能獲得変異体を用いたトバモウイルス抵抗性タンパク質による認識機構の解析、平成25年度日本植物病理学会大会 2013年3月27日、岐阜市、岐阜大学

Sekine, K.-T., Tomita, R., Atsumi, G., Chen, H., Kaido, M., Yamaoka, N., Nishiguchi, M., Okuno, T., Kobayashi, K., The binding affinity to viral

coat proteins determines the recognition specificity of allelic L tobamovirus resistance proteins. XV International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions, 2012年7月29日、京都、京都国際会議場

関根健太郎・富田麗子・厚見剛・小林括平, トバモウイルス粒子長桿化変異体のL抵抗性タンパク質による認識の回避、平成26年度日本植物病理学会大会 2014年6月2日、札幌市、札幌コンベンションセンター

[その他]

岩手生物工学研究センター

植物病態分子研究チームホームページ

<http://ppathol.ibrc.or.jp/>

6. 研究組織

研究代表者

関根 健太郎 (SEKINE, Ken-Taro)

岩手生工研・生命科学研究部・主任研究員

研究者番号：30574058