

4. 植物の *R* 遺伝子によるウイルス抵抗性

宮下 脩平, 高橋 英樹

東北大学大学院農学研究科

植物は獲得免疫をもたない。その代替として、多数の NB-LRR 型免疫レセプターによりそれぞれの病原体を特異的に認識し、抵抗性反応を誘導する機構を持っている。NB-LRR 型免疫レセプターをコードする遺伝子は、これまでに植物で報告された優性抵抗性遺伝子 (*R* 遺伝子) の大半を占める。本稿では植物ウイルスの認識に関わる NB-LRR 型 *R* 遺伝子について、抵抗性メカニズム・進化・農業上の利用の観点から概説するとともに、近年明らかになった miRNA やイントロンによる NB-LRR 型 *R* 遺伝子の発現調節機構について紹介する。また、NB-LRR 型 *R* 遺伝子が引き起こす興味深い現象の一つにウイルス感染開始点周辺のプログラム細胞死があるが、それが植物の生存戦略にもたらす意義については明らかでない。これについて、筆者らの実験結果や生態学的見地からの推論をもとに議論する。

1. 植物の NB-LRR 型 *R* 遺伝子によるウイルス抵抗性

植物も動物と同様に多くの病原体と闘っている。ウイルスのほかに、糸状菌 (カビ)・卵菌・細菌・線虫といった病原体が植物にとっての脅威である。個々の病原体に対して特異的な抵抗性を付与する優性遺伝子は総称して *R* 遺伝子と呼ばれる。これまでに報告された *R* 遺伝子がコードするタンパク質の多くは、動物の NOD-like レセプターと相同性をもつ、NB-LRR 型 (nucleotide binding domain および leucine rich repeat をもつ) 免疫レセプターである (図 1A)。動物の NOD-like レセプターは MAMPs (microbe-associated molecular patterns) を認識して基礎的な抵抗性を誘導するとされるが、植物の NB-LRR 型免疫レセプターは病原体となる生物種あるいはその一部の系統の遺伝子産物を特異的に認識し、強い抵抗性反応を誘導する。植物は個々の病原体に特異的に対応すべく NB-LRR 型の *R* 遺伝子をゲノム中に有していると考えられている。例えば

モデル植物であるシロイヌナズナの代表的エコタイプ Col-0 のゲノムには、およそ 150 の NB-LRR 型遺伝子があり¹⁾、イネのゲノムではその数はおよそ 600 に上ることが報告されている²⁾。これらのうち認識される病原体が判明しているものはごく一部であるが、植物ではこのように多数の NB-LRR 型 *R* 遺伝子が動物における獲得免疫を代替しているとされる。

植物ウイルスを認識する NB-LRR 型 *R* 遺伝子はこれまでに 18 遺伝子が報告されている³⁾。タバコ野生種 *Nicotiana glutinosa* から栽培タバコ *N. tabacum* に導入された NB-LRR 型 *R* 遺伝子である *N* 遺伝子は、(+) 鎖 RNA ウイルスであるタバコモザイクウイルス (TMV, tobacco mosaic virus) の複製タンパク質を認識する^{4,5)}。その結果、過敏感反応 (HR, hypersensitive response) といわれる抵抗性反応が起こり、ウイルスは数十～数百細胞に感染したあたりで感染を拡大できなくなる。この際、感染開始点周辺の迅速なプログラム細胞死が起こり、局部壊死病斑が形成される (図 1B)。細胞死は多くの植物—病原体の組み合わせで観察されている。細胞死がウイルスの感染拡大阻止に直接寄与するか否かについては後で議論するが、いずれにせよ *N* 遺伝子の存在により TMV は接種した葉から他の葉へ移行できなくなる。このとき非接種葉でも抵抗性が誘導されており、新たに TMV を接種しても感染性が低いことが知られている。このような抵抗性は全身獲得抵抗性 (SAR, systemic acquired resistance) と呼ばれる⁶⁾ (図 1C)。ジャガイモの NB-LRR 型 *R* 遺伝子である *Rx* 遺伝子は、(+)

連絡先

〒 981-8555

宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1

東北大学大学院農学研究科

TEL: 022-717-8655

FAX: 022-717-8659

E-mail: takahash@bios.tohoku.ac.jp

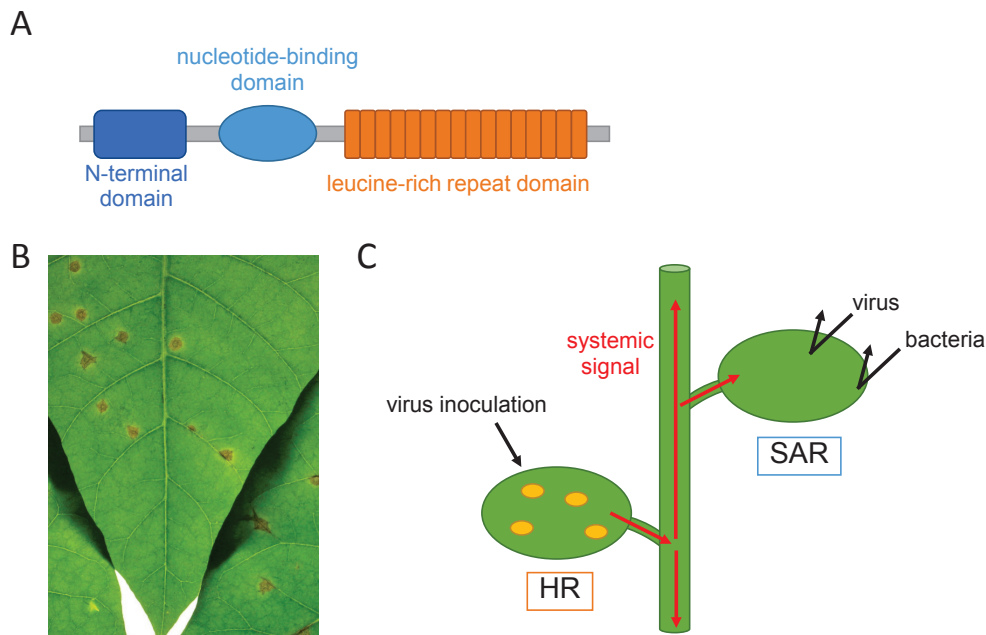


図1 NB-LRR型R遺伝子による抵抗性

- A) 典型的なNB-LRR型Rタンパク質のドメイン構造. N-terminal domainは、Toll interleukin-1 receptor-like domainかcoiled-coil domainであるものが多い。
 B) N遺伝子によるタバコモザイクウイルス(TMV)認識で生じる局部壊死病斑
 C) 過敏反応(HR)と全身獲得抵抗性(SAR)の概念図

鎖RNAウイルスであるジャガイモXウイルス(PVX, potato virus X)の外被タンパク質(CP, capsid protein)を認識し、このウイルスの増殖を抑制する。このとき細胞死は観察されず、一細胞レベルでウイルスの増殖が抑えられることから、このような抵抗性反応はHRとは区別してER (extreme resistance)と言われる⁷⁾。しかしRxタンパク質とPVXのCPを*N. benthamiana*や*N. tabacum*で発現した際にHRで起こると同様の細胞死が起きることから、HRとERの間に本質的な違いはない可能性が指摘されている^{7,8)}。

R遺伝子による病原体の認識に伴って、多数の遺伝子の発現が変動する。例えば後述のシロイヌナズナ*RCY1*遺伝子によりキュウリモザイクウイルス黄斑系統が認識された場合、接種48時間後の接種葉では約700以上の遺伝子のmRNA量が3倍以上または1/3以下になることを筆者らは明らかにしている⁹⁾。R遺伝子により発現される病原体抵抗性の特異性は低く、例えばNB-LRR型R遺伝子によってturnip crinkle virus (TCV)が認識された場合に、植物病原性細菌に対するSARが観察されている¹⁰⁾。また、NB-LRR型R遺伝子による病原体の認識により植物ホルモンであるサリチル酸の蓄積量が植物体内で増加することが知られており¹¹⁾など、SARにサリチル酸が関与することなどから¹²⁻¹⁴⁾、サリチル酸の合成やサリチル酸への応答についてはよく研究されている(Vlotらによる総説¹⁵⁾

に詳しい)。例えばサリチル酸はRNAi機構の構成要素である*RDR1* (RNA-dependent RNA polymerase 1) 遺伝子の発現を誘導する^{16,17)}。タバコ*RDR1*遺伝子のノックダウンやシロイヌナズナ*RDR1*遺伝子のノックアウトによりTMVなどのRNAウイルスの蓄積量が接種葉・上位葉で増加することなどから^{16,17)}、NB-LRR型R遺伝子によるRNAウイルス抵抗性にはサリチル酸による*RDR1*誘導が寄与する可能性がある。ただし後述の通り、ウイルス抵抗性はサリチル酸の寄与だけでは説明できないことが筆者らの研究により明らかになっており、NB-LRR型R遺伝子によって誘導されるウイルス抵抗性の全容はいまだに把握し難い。

2. キュウリモザイクウイルス黄斑系統抵抗性遺伝子 *RCY1* とR遺伝子の進化

キュウリモザイクウイルス(CMV, cucumber mosaic virus)は3分節の(+)鎖RNAをゲノムとするウイルスである(図2A)。宿主にはキュウリやメロンといったウリ科植物の他に、アブラナ科やナス科などの双子葉植物、さらにはトウモロコシやバナナ、ユリなどの単子葉植物も含まれ、系統による特異性はあるものの、一つのウイルス種としては非常に広い範囲の宿主に感染して被害をもたらしている^{18,19)}。これまでに筆者らは、モデル植物であるシロイヌナズナ(アブラナ科)のエコタイプC24がCMV

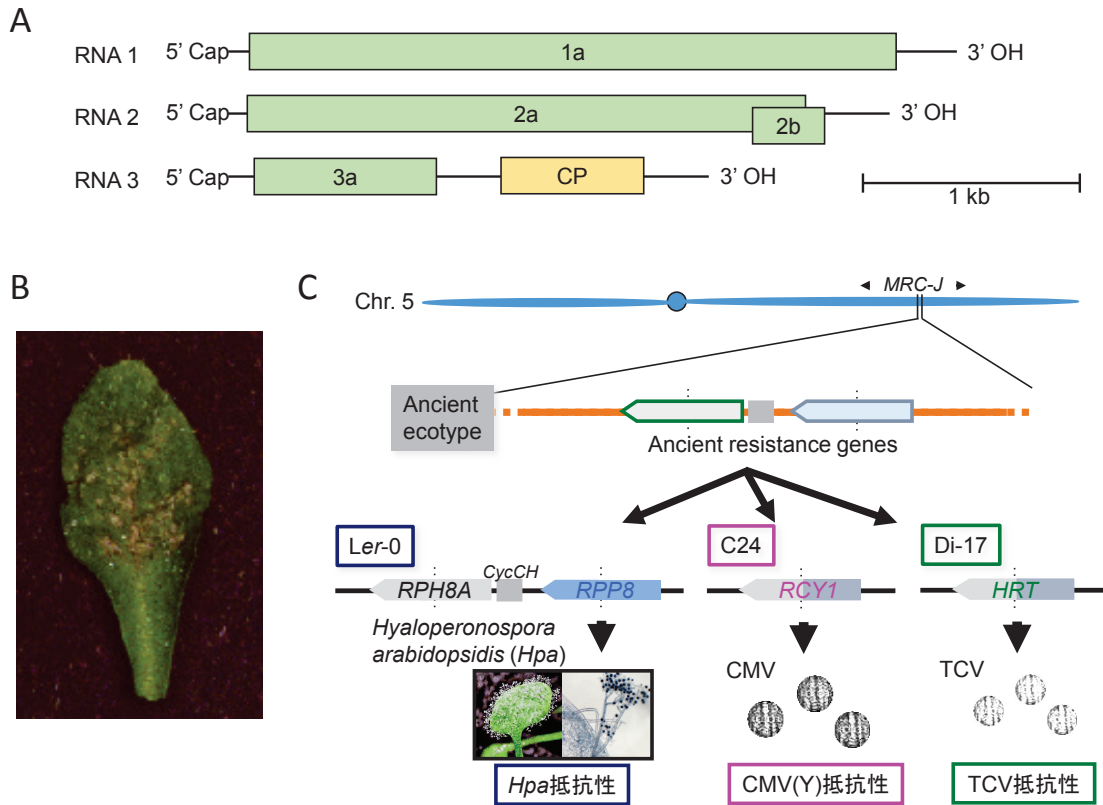


図2 キュウリモザイクウイルス黄斑系統 [CMV(Y)] を認識するシロイヌナズナ *RCY1* 遺伝子

A) CMV(Y) のゲノム構造. 1a と 2a は複製タンパク質, 2b はサイレンシングサブプレッサータンパク質, 3a は細胞間移行タンパク質としての機能をもつ. CP が *RCY1* による認識に関与する.

B) *RCY1* 遺伝子をもつシロイヌナズナエコタイプ C24 への CMV(Y) 接種で生じる局部壊死病斑

C) *RPP8/HRT1/RCY1* 座位の概略図

黄斑系統 [CMV (Y)] に対する *R* 遺伝子 (*RCY1* と命名, resistance to CMV (Y)) をもっており, CMV (Y) の CP を認識して HR を起こすこと, *RCY1* 遺伝子が NB-LRR 型のタンパク質をコードしていることを明らかにした²⁰⁻²²⁾ (図 2B). また, サリチル酸や別の植物ホルモンとして知られるエチレンやジャスモン酸を介したシグナル伝達経路に関わる遺伝子について, シロイヌナズナの変異系統を利用した遺伝学的解析を行った. その結果, サリチル酸・エチレンを介したシグナル伝達経路がそれぞれ *RCY1* 遺伝子による CMV (Y) 抵抗性に寄与することが明らかになったほか, これら以外の経路も抵抗性に寄与している可能性が明らかとなった²²⁾.

シロイヌナズナのエコタイプ Ler-0 と Di-17 では, エコタイプ C24 における *RCY1* 遺伝子座位に *RCY1* と高い相同性を有する NB-LRR 型 *R* 遺伝子 (*RPP8* および *HRT* 遺伝子) がそれぞれ座落しており, それぞれアブラナ科べと病菌, turnip crinkle virus (TCV) に対する抵抗性を付与している²³⁾ (図 2C). このことは, エコタイプが分化する過程で *R* 遺伝子も分化し, それぞれのエコタイプが生育する環境で脅威となりうる病原体に対応してきた可能性

を示唆する (ただし逆に, *R* 遺伝子の分化が病原体の分布と協調してエコタイプの分化を促した可能性も考えうる). 上述の通り NB-LRR 型 *R* 遺伝子は植物ゲノム中に多数存在するが, そのうち認識する病原体が明らかになったものはごく一部にとどまる. 残りの大多数の遺伝子が何を認識するかを探索することは, NB-LRR 型 *R* 遺伝子の進化の歴史を知ることにつながるだけでなく, 農業上有用な NB-LRR 型 *R* 遺伝子を得るために有効かもしれない. なぜなら, アグロバクテリウムを用いた遺伝子導入によりシロイヌナズナに由来する *RCY1* タンパク質と CMV (Y) の CP を *N. benthamiana* で一過的に発現した場合や, ジャガイモに由来する Rx タンパク質と PVX の CP を *N. benthamiana* や *N. tabacum* で発現した場合に HR が起きた場合と同様の細胞死が観察されることから, NB-LRR 型 *R* 遺伝子による病原体認識以降の応答は植物種間で広く保存されていると考えられ, 有用な NB-LRR 型 *R* 遺伝子さえ単離して目的の作物に導入すれば病原体抵抗性を付与できる可能性が期待できるからである. 実際に, そのようにして作出された病害抵抗性遺伝子組換え作物がすでに複数報告されている (Dangl らによる 総説²⁴⁾ に詳しい). 一方, NB-LRR 型 *R*

遺伝子配列に人為的に改変を加えることにより、認識される病原体の範囲を変える試みもなされている。Rx 遺伝子は PVX の一部の系統の CP しか認識できないことが知られているが、Rx 遺伝子の LRR ドメインコード領域に error-prone PCR によりランダムな変異を導入することで、それまで認識できなかった PVX 他系統の CP のみならず、PVX (*Tymovirales* 目 *Alphaflexiviridae* 科) とは同日異科 (*Tymovirales* 目 *Betaflexiviridae* 科) に分類される poplar mosaic virus (つまり遠縁なウイルス) の CP を認識できるようになったとの報告がある²⁵⁾。このことは農業上有用な R 遺伝子を自由に創出できる可能性を示唆すると同時に、自然界における NB-LRR 型 R 遺伝子は何らかの理由で病原体認識の特異性を高める方向に進化する傾向にある可能性も示唆する。

3. NB-LRR 型 R 遺伝子の発現調節機構

植物において NB-LRR 型 R 遺伝子を人為的に過剰発現した場合、病原体非依存的な細胞死や植物体の矮化をもたらす例が数多く報告されている。一方、発現量が不十分であれば病原体抵抗性を発揮できない。そのため NB-LRR 型 R 遺伝子の発現量は、適切な量となるよう制御されているものと考えられる。そのような制御には動的なものと静的なものがあり、機構としては転写活性の調節やスプライシング、RNAi によるものなどが知られている。

ウイルス感染による NB-LRR 型 R 遺伝子の動的な発現制御については、いくらかの知見がある。例えば N 遺伝子では、TMV の感染に伴ってタバコ接種葉および非接種上位葉で mRNA の蓄積量が大きく上昇することが知られている²⁶⁾。非接種葉における N 遺伝子の発現上昇は、未感染の細胞が TMV に対し予め備えるというメリットが考えられる。また、TMV 感染にともなって N 遺伝子のオルタナティブスプライシングが起こることも報告されている²⁷⁾。具体的には、非接種時に存在する mRNA (N_S) は翻訳されると全長の N タンパク質が合成されるが、TMV を接種するとスプライシングパターンが変化した mRNA (N_L) が作られるようになり、その翻訳によって合成されるのは LRR ドメインのほとんどを欠いたもの (N^L) になる、という結果である。この変化は TMV 接種後 6 時間で最も顕著になり、 N_S はほとんど作られず N_L ばかりが作られる。cDNA を利用して N タンパク質か N^L タンパク質のいずれかのみを発現する系では TMV の感染拡大を抑えられなかったのに対し、イントロンを含むゲノム由来の N 遺伝子配列を利用して N と N^L の両方が発現されうる系では TMV の感染拡大が抑えられたことから、N と N^L の両方が発現されることが TMV 抵抗性に必要である可能性を論文の著者らは指摘している。しかし後述のように、R 遺伝子内のイントロンの存在が R タンパク質の翻訳に影響すると考えられる例もあることから²⁸⁾、この結果は慎重に

解釈する必要がある。R 遺伝子の機能におけるオルタナティブスプライシングの役割は未だに明らかではないと考えるのが妥当と思われる。

近年、micro RNA (miRNA) を介した R 遺伝子の発現制御について相次いで報告がなされた (図 3A)。Zhai ら²⁹⁾ はマメ科のモデル植物であるタルウマゴヤシの small RNA (sRNA) ライブラリの解析を行い、miRNA を介した mRNA 切断後に RDR6・DCL4 依存的に生じる siRNA の末端が揃う現象に着目することで、miRNA による制御を受けうる遺伝子を多数発見した。そのような遺伝子には NB-LRR 型の R 遺伝子が 79 遺伝子含まれており、そのうち 74 遺伝子はたった 3 グループの miRNA により制御されうることを明らかにした。Li ら³⁰⁾ は、ナス科植物である *N. tabacum* (タバコ)、トマト、ジャガイモの sRNA ライブラリから R 遺伝子と相同性をもつものを探索することで、R 遺伝子とその mRNA を標的とする miRNA の組み合わせを複数発見した。それらの R 遺伝子には上述の N 遺伝子、Rx 遺伝子や、N 遺伝子とは別の TMV 抵抗性遺伝子である *Tm-2²* 遺伝子、(-) 鎖 RNA ウイルスであるトマト黄化えそウイルス (TSWV, tomato spotted wilt virus) 抵抗性遺伝子である Sw5 遺伝子のほか、糸状菌・卵菌・線虫抵抗性遺伝子も複数含まれていた。また、N 遺伝子を標的とする 2 つの miRNA については詳しい解析を行い、これらの miRNA の一過的過剰発現により N 遺伝子配列を含む mRNA が切断されることや、それに伴って RDR6 依存的に siRNA が生成すること、さらに TMV 接種時の N 遺伝子依存的な HR が抑制されることを報告している。Shivaprasad ら³¹⁾ はトマトの sRNA から相同性の高い 6 種の miRNA 群を同定し、これらがトマトで知られる 186 の NB-LRR 型 R 遺伝子のうち約 3 割に当たる 58 遺伝子の mRNA を標的とする可能性を明らかにした。6 種の miRNA はそれぞれ複数の mRNA を標的としており、58 遺伝子のうち大半の mRNA は複数の miRNA によって標的とされている可能性が明らかになっている。植物ウイルスの多くは RNA サイレncing サプレッサー (VSR, viral suppressors of RNA silencing) をコードしており、それぞれの VSR は RNAi 経路のさまざまな段階を阻害することが知られている³²⁾。また、植物病原細菌や植物病原卵菌にも RNAi 経路を阻害する分泌タンパク質である BSR (bacterial suppressors of RNA silencing) や PSR (Phytophthora-encoded suppressors of RNA silencing) をコードするものがあることが知られている^{33, 34)}。Shivaprasad ら³¹⁾ は異なるタイプの VSR をコードする TCV・CMV・タバコ茎えそウイルスの感染や BSR をコードする細菌 *Pseudomonas syringae* の感染により上述の miRNA 群が標的とする R 遺伝子の mRNA 蓄積量が上昇したことから、植物病原体のもつ RNA サイレncing サプレッサーにより miRNA を介した R 遺伝子 mRNA の発現抑制が解除されたと結論付け、miRNA による R 遺伝子の発現制御

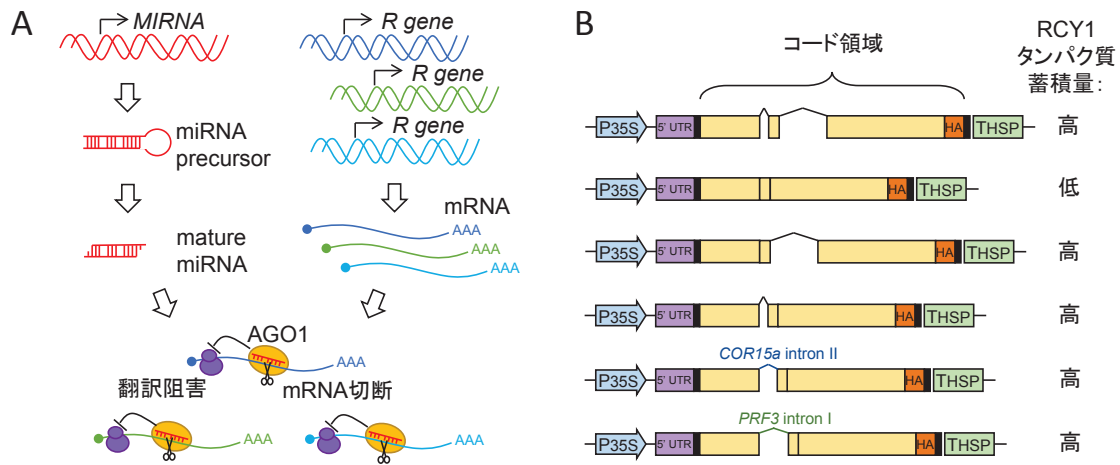


図3 NB-LRR型R遺伝子の発現制御

- A) miRNAによる複数のR遺伝子の発現制御
 B) RCY1遺伝子イントロンの遺伝子産物蓄積への寄与

は病原体の検知とR遺伝子発現上昇を直接的に結びつける仕組みとして機能する可能性を指摘している。

一方で病原体の感染によるR遺伝子の誘導は、それほど一般的ではないことも知られている。例えばシロイヌナズナに細菌由来のMAMPを処理した場合に発現が誘導されるのは、約150のNB-LRR型遺伝子のうち8遺伝子のみである³⁵⁾。筆者らが研究対象としているRCY1遺伝子—CMV (Y)の組み合わせでも、CMV (Y)感染による発現誘導はmRNA蓄積レベル、タンパク質蓄積レベルのいずれにおいても観察されていない^{28, unpublished data)}。

最近筆者らはRCY1タンパク質を*N. benthamiana*で一過的に発現する際に、RCY1遺伝子のcDNA配列を用いる場合よりもRCY1遺伝子のゲノムDNA配列を用いる場合のほうがRCY1タンパク質の蓄積が数倍程度に高くなることを見出した²⁸⁾ (図3B)。mRNAの蓄積量にそのような差は見られず、ゲノム由来のプロモーターを用いた場合とカリフラワーモザイクウイルス (CaMV, cauliflower mosaic virus) 由来の35Sプロモーターを用いた場合のいずれの場合にも同様のRCY1タンパク質蓄積量の差が観察されたことから、ゲノムDNAのRCY1コード領域内部に発現量を制御するエレメントが存在するものと考えられた。RCY1コード領域には2つのイントロンが存在する。そこで、これら2つのイントロンのいずれか片方を除いたコンストラクトを作製して、ゲノムDNA配列を用いた場合やcDNA配列を用いた場合 (すなわち両方のイントロンを除くことに相当) と比較したところ、いずれか片方のイントロンがある場合にはゲノムDNA配列を用いた場合と同等のRCY1タンパク質の高蓄積が見られた。また、1つ目のイントロンを他の遺伝子のイントロンに置き換え、

2つ目のイントロンを除いた場合にもRCY1タンパク質はゲノムDNA配列を用いた場合と同程度に蓄積した。これらの結果から、RCY1タンパク質の高蓄積にはイントロンの配列は重要ではなく、イントロンの存在自体が重要であることが示唆された。イントロンの切り出しに伴っていくつかのタンパク質からなるEJC (exon junction complex) がmRNA上に形成され、これがタンパク質の翻訳に寄与することが動物で示されている³⁶⁾。植物にもEJCを構成するタンパク質のホモログが存在することから³⁷⁻³⁹⁾、EJCの形成がRCY1の高蓄積に寄与している可能性がある。また、シロイヌナズナのエコタイプCol-0がもつ約150のNB-LRR型遺伝子のうち100以上の遺伝子がイントロンをもち、特にそのうち16遺伝子はRCY1遺伝子と共通のイントロン挿入パターンを有している¹⁾。これらの遺伝子でRCY1遺伝子の場合と同様のイントロンを介したタンパク質発現制御がなされているかどうかは興味深い。

4. 細胞死はウイルスの感染拡大阻止に必要か

R遺伝子依存的な細胞死は、ウイルスの感染拡大阻止に寄与するとされることも多い。しかし上述のように、細胞死を伴わないER型のウイルス封じ込めが起こる場合があることから、ウイルスの封じ込めに細胞死は必要ではないとも考えられている⁷⁾。筆者らはシロイヌナズナエコタイプC24から単離したRCY1遺伝子を、RCY1遺伝子をもたないエコタイプCol-0に導入した形質転換体を複数作出し、CMV (Y) に対する応答を調べた⁴⁰⁾。RCY1遺伝子の発現にはゲノム由来のプロモーターを用いたが、導入された遺伝子コピー数などの影響により形質転換体ごとにRCY1タンパク質蓄積量は異なる。RCY1タンパク質蓄積

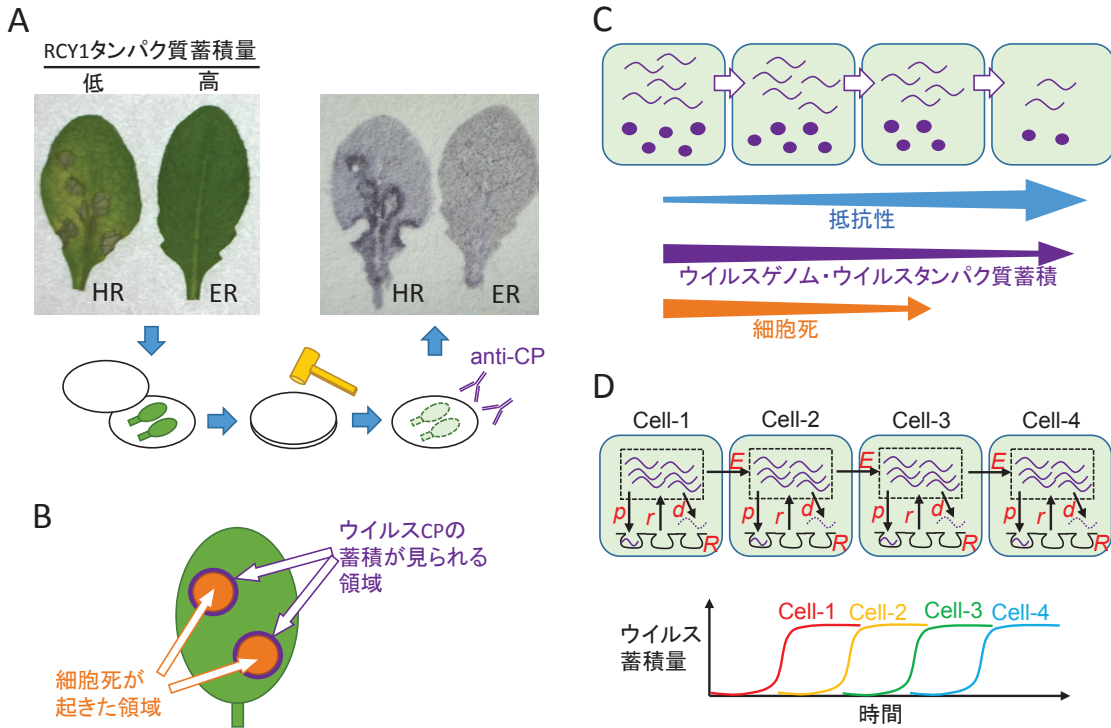


図4 抵抗性反応と細胞死の関係

- A) RCY1 タンパク質蓄積量による抵抗性反応の違い (文献40より改変). 接種葉をハンマープロット法で濾紙に転写し、抗原抗体反応によりウイルスCPを検出した.
- B) 細胞死領域外側の環状の領域におけるウイルス蓄積の概念図
- C) 抵抗性反応, 細胞死とウイルスの広がりモデル
- D) R 遺伝子非存在下でのウイルス感染過程の数理モデル. E : 細胞に侵入するゲノム数; p : 単位時間当たり複製複合体形成確率; r : 単位時間当たりゲノム RNA 合成数; d : 単位時間当たりゲノム分解確率; R : 複製複合体形成の場の数

量が比較的低い形質転換体ではC24の場合と同様にCMV (Y) 接種によりHRが観察されたのに対し, RCY1タンパク質蓄積量が高い形質転換体では細胞死・ウイルス増殖のいずれも検出されないERが起こった(図4A). この結果は, 先述の Rx 遺伝子に関する研究^{7,8)} で示唆された「HRとERの間に本質的な違いはない」という考えを支持する. また, 細胞死が観察された個体では細胞死が起こった領域の外側に環状にCMV (Y) のCPの蓄積が検出された(図4B). つまり細胞死が起きた領域の外側にまでウイルスは感染域を拡大しているが, それ以上には拡大していない状態である. このことはRCY1によるCMV (Y) の感染拡大阻止は細胞死に依存しておらず, その他の抵抗性反応により実現している可能性を示唆する. そこで, 植物の細胞死に少なくとも部分的に寄与するとされる遺伝子 $Dnd1$ の変異を上述のRCY1発現HR型Col-0形質転換体に導入してCMV (Y) を接種したところ, 予想通り細胞死を起こすことなくウイルスの感染拡大阻止が起こることが確認された⁴¹⁾. 細胞死が起こった領域の外側でのウイルスの蓄積は, RCY1遺伝子—CMV (Y) の組み合わせ以外にも N

遺伝子—TMVの組み合わせ⁴²⁾ などでも報告されている. これらの結果は「 R 遺伝子によるウイルスの感染拡大阻止は細胞死以外の抵抗性反応により起こり, 細胞死はウイルスがある程度以上増殖した細胞で事後的に起こる」と考えると, ERで細胞死が起きないことも含めて合理的に説明できる(図4C). このアイデアを検証するためには, ウイルスの複製, 細胞間移行およびタンパク質蓄積と植物細胞間の抵抗性反応や細胞死の広がり関係を解析する必要がある. 筆者らはこれまでに, R 遺伝子非存在下における(+)鎖RNAウイルスの複製と細胞間移行による感染拡大の動態を, ウイルスゲノム分子の挙動に基づいて記述する数理モデルを構築している⁴³⁾(図4D). このモデルを改変し, 上述のような解析に適用可能なモデルに発展させたいと考えている.

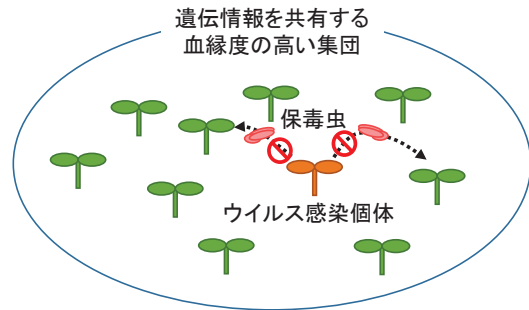
5. 事後的な細胞死と植物の生存戦略

細胞死は事後的に起こるもので, ウイルスの感染拡大阻止に寄与しないとすると, 植物の生存戦略上どのようなメリットがありうるだろうか? また, ウイルスと宿主植物の

A



B



細胞死が起こることで、周囲の植物体は感染を免れる

図5 細胞死と植物の生存戦略

A) シロイヌナズナの全身壊死病徴

B) 血縁度の高い宿主植物集団中でのウイルスの伝搬

組み合わせによっては植物体全体に細胞死が広がり、全身が壊死することが知られている (図5A)。この現象にはHRによる細胞死の場合と同じシグナル伝達経路が関与する可能性が明らかにされており⁴⁴⁾、抵抗性反応の強度が不十分な場合に起こると考えられている。このことから全身壊死は植物にとって生存戦略上の失敗であると言われることが多いが、本当に失敗と言えるだろうか？これらの疑問は、自然界の植物やそれに感染する植物ウイルスとその媒介生物の生態を考えることで解決できる可能性がある。植物は動物と違って移動する能力をもたない。その結果として自然界では、種の発芽から受粉・結実と種の落下のサイクルが狭い範囲で繰り返され、血縁度の高い植物個体が寄り集まって存在することになる。植物ウイルスの多くは、アブラムシなどの小さい昆虫によって媒介されるが、これらの昆虫の移動距離も平均で5~13メートルとそれほど長くない⁴⁵⁾。そのため、感染植物で媒介昆虫がウイルスを獲得して次の植物個体に移動する場合、その昆虫の行き先は感染植物個体と血縁度の高い植物個体である可能性が非常に高い (図5B)。このような状況下では、ウイルスに感染してしまった植物個体はたとえ全身壊死してでも周囲の「一族郎党」の感染源となってしまう状況を避けるという生存戦略が成り立ちうる。そう考えると、HRによる局所的な細胞死と全身壊死は細胞死の起こる範囲こそ違うものの、自然界では基本的に同じ生存戦略として機能すると見なすことができる。一方、農業の現場において植物個体が全身壊死することは、商品自体やその生産手段が失われることを意味するため、なるべく避けたいところである。そのためには、細胞死を伴わずに強い抵抗性反応が起きる作物を作出することが必要である。細胞死がウイルス感染の事後的に起こるものとすれば、そのような作物を人為的に作出することはそれほど困難なことではないのかも知れない。

6. おわりに

植物のNB-LRR型R遺伝子によるウイルス抵抗性機構について、R遺伝子の発現調節機構から集団レベルでの生存戦略まで、筆者らの研究成果や推論も交えて概観した。また本稿ではほとんど紹介できなかったが、R遺伝子による病原体認識以降にどのような遺伝子や植物ホルモンが病原体抵抗性の発現に関与しているかについては、多くの研究者が世界中で精力的に研究しており、その成果についてはVlotら¹⁵⁾やDenancéら⁴⁶⁾などの総説に詳しく紹介されている。参考にされたい。

謝辞

本稿で紹介した研究の一部は、当時学生として研究室に在籍した関根健太郎博士、石原岳明博士によるものである。ここに感謝する。また、本稿執筆の機会を与えてくださった松浦善治博士に深謝する。

参考文献

- 1) Meyers BC, Kozik A, Griego A, Kuang H, Michelmore RW.: Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:809-834, 2003.
- 2) Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J, Miguel T, Paszkowski U, Zhang S, Colbert M, Sun WL, Chen L, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalima T, Oliphant A, Briggs S.: A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science* 296:92-100, 2002.

- 3) de Ronde D, Butterbach P, Kormelink R.: Dominant resistance against plant viruses. *Front Plant Sci* 5:307, 2014.
- 4) Padgett HS, Beachy RN.: Analysis of a tobacco mosaic virus strain capable of overcoming *N* gene-mediated resistance. *Plant Cell* 5:577-586, 1993.
- 5) Whitham S, Dinesh-Kumar SP, Choi D, Hehl R, Corr C, Baker B.: The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 78:1101-1115, 1994.
- 6) Ross AF.: Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* 14:340-358, 1961.
- 7) Bendahmane A, Kanyuka K, Baulcombe DC.: The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* 11:781-792, 1999.
- 8) Bendahmane A, Farnham G, Moffett P, Baulcombe DC.: Constitutive gain-of-function mutants in a nucleotide binding site-leucine rich repeat protein encoded at the *Rx* locus of potato. *Plant J* 32:195-204, 2002.
- 9) Ishihara T, Sakurai N, Sekine KT, Hase S, Ikegami M, Shibata D, Takahashi H.: Comparative analysis of expressed sequence tags in resistant and susceptible ecotypes of *Arabidopsis thaliana* infected with cucumber mosaic virus. *Plant Cell Physiol* 45:470-480, 2004.
- 10) Uknes S, Winter A, Delaney T, Vernooij B, Morse A, Friedrich L, Nye G, Potter S, Ward E, Ryals J.: Biological induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact* 6:692-698, 1993.
- 11) Malamy J, Carr JP, Klessig DF, Raskin I.: Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250:1002-1004, 1990.
- 12) Yalpani N, Silverman P, Wilson TM, Kleier DA, Raskin I.: Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell* 3:809-818, 1991.
- 13) Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J.: Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261:754-756, 1993.
- 14) Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann H, Ward E, Ryals J.: A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266:1247-1250, 1994.
- 15) Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF.: Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* 47:177-206, 2009.
- 16) Xie Z, Fan B, Chen C, Chen Z.: An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6516-6521, 2001.
- 17) Yu D, Fan B, MacFarlane SA, Chen Z.: Analysis of the involvement of an inducible *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. *Mol Plant Microbe Interact* 16:206-216, 2003.
- 18) Douine L, Quiot J, Marchoux G, Archange P.: Recensement des espèces végétales sensibles au virus de la mosaïque du concombre (CMV). Etude bibliographique. *Ann Phytopathol* 11:439-475, 1979.
- 19) Palukaitis P, Roossinck MJ, Dietzgen RG, Francki RI.: Cucumber mosaic virus. *Adv Virus Res* 41:281-348, 1992.
- 20) Takahashi H, Goto N, Ehara Y.: Hypersensitive response in cucumber mosaic virus-inoculated *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 6:369-377, 1994.
- 21) Takahashi H, Suzuki M, Natsuaki K, Shigyo T, Hino K, Teraoka T, Hosokawa D, Ehara Y.: Mapping the virus and host genes involved in the resistance response in cucumber mosaic virus-infected *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 42:340-347, 2001.
- 22) Takahashi H, Miller J, Nozaki Y, Takeda M, Shah J, Hase S, Ikegami M, Ehara Y, Dinesh-Kumar SP, Sukamoto.: *RCY1*, an *Arabidopsis thaliana* *RPP8/HRT* family resistance gene, conferring resistance to cucumber mosaic virus requires salicylic acid, ethylene and a novel signal transduction mechanism. *Plant J* 32:655-667, 2002.
- 23) Cooley MB, Pathirana S, Wu HJ, Kachroo P, Klessig DF.: Members of the *Arabidopsis* *HRT/RPP8* family of resistance genes confer resistance to both viral and oomycete pathogens. *Plant Cell* 12:663-676, 2000.
- 24) Dangl JL, Horvath DM, Staskawicz BJ.: Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* 341:746-751, 2013.
- 25) Farnham G, Baulcombe DC.: Artificial evolution extends the spectrum of viruses that are targeted by a disease-resistance gene from potato. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:18828-18833, 2006.
- 26) Levy M, Edelbaum O, Sela I.: Tobacco mosaic virus regulates the expression of its own resistance gene *N*. *Plant Physiol* 135:2392-2397, 2004.
- 27) Dinesh-Kumar SP, Baker BJ.: Alternatively spliced *N* resistance gene transcripts: their possible role in tobacco mosaic virus resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1908-1913, 2000.
- 28) Sato Y, Ando S, Takahashi H.: Role of intron-mediated enhancement on accumulation of an *Arabidopsis* NB-LRR class R-protein that confers resistance to cucumber mosaic virus. *PLoS One* 9:e99041, 2014.
- 29) Zhai J, Jeong DH, De Paoli E, Park S, Rosen BD, Li Y, González AJ, Yan Z, Kitto SL, Grusak MA, Jackson SA, Stacey G, Cook DR, Green PJ, Sherrier DJ, Meyers BC.: MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, *trans*-acting siRNAs. *Genes Dev* 25:2540-2553, 2011.
- 30) Li F, Pignatta D, Bendix C, Brunkard JO, Cohn MM, Tung J, Sun H, Kumar P, Baker B.: MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:1790-1795, 2012.
- 31) Shivaprasad PV, Chen HM, Patel K, Bond DM, Santos BA, Baulcombe DC.: A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site-leucine-rich repeats and other mRNAs. *Plant Cell* 24:859-874, 2012.
- 32) Pumplin N, Voinnet O.: RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and coun-

- ter-counter-defence. *Nat Rev Microbiol* 11:745-760, 2013.
- 33) Navarro L, Jay F, Nomura K, He SY, Voinnet O: Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science* 321:964-967, 2008.
 - 34) Qiao Y, Liu L, Xiong Q, Flores C, Wong J, Shi J, Wang X, Liu X, Xiang Q, Jiang S, Zhang F, Wang Y, Judelson HS, Chen X, Ma W.: Oomycete pathogens encode RNA silencing suppressors. *Nat Genet* 45:330-333, 2013.
 - 35) Tan X, Meyers BC, Kozik A, West MA, Morgante M, St Clair DA, Bent AF, Michelmore RW.: Global expression analysis of nucleotide binding site-leucine rich repeat-encoding and related genes in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol* 7:56, 2007.
 - 36) Glisovic T, Bachorik JL, Yong J, Dreyfuss G.: RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett* 582:1977-1986, 2008.
 - 37) Park NI, Muench DG.: Biochemical and cellular characterization of the plant ortholog of PYM, a protein that interacts with the exon junction complex core proteins Mago and Y14. *Planta* 225:625-639, 2007.
 - 38) Koroleva OA, Calder G, Pendle AF, Kim SH, Lewandowska D, Simpson CG, Jones IM, Brown JW, Shaw PJ.: Dynamic behavior of *Arabidopsis* eIF4A-III, putative core protein of exon junction complex: fast relocation to nucleolus and splicing speckles under hypoxia. *Plant Cell* 21:1592-1606, 2009.
 - 39) Mufarrege EF, Gonzalez DH, Curi GC.: Functional interconnections of *Arabidopsis* exon junction complex proteins and genes at multiple steps of gene expression. *J Exp Bot* 62:5025-5036, 2011.
 - 40) Sekine KT, Kawakami S, Hase S, Kubota M, Ichinose Y, Shah J, Kang HG, Klessig DF, Takahashi H.: High level expression of a virus resistance gene, *RCY1*, confers extreme resistance to cucumber mosaic virus in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* 21:1398-1407, 2008.
 - 41) Takahashi H, Kai A, Yamashita M, Ando S, Sekine K, Kanayama Y, Tomita H.: Cyclic nucleotide-gated ion channel-mediated cell death may not be critical for *R* gene-conferred resistance to cucumber mosaic virus in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Mol Plant Pathol* 79:40-48, 2012.
 - 42) Wright KM, Duncan GH, Pradel KS, Carr F, Wood S, Oparka KJ, Cruz SS.: Analysis of the *N* gene hypersensitive response induced by a fluorescently tagged tobacco mosaic virus. *Plant Physiol* 123:1375-1386, 2000.
 - 43) Miyashita S, Ishibashi K, Kishino H, Ishikawa M. Viruses roll the dice: the stochastic behavior of viral genome molecules accelerates viral adaptation at the cell and tissue levels. *PLoS Biol* 13:e1002094, 2015.
 - 44) Komatsu K, Hashimoto M, Ozeki J, Yamaji Y, Maejima K, Senshu H, Himeno M, Okano Y, Kagiwada S, Namba S.: Viral-induced systemic necrosis in plants involves both programmed cell death and the inhibition of viral multiplication, which are regulated by independent pathways. *Mol Plant Microbe Interact* 23:283-293, 2010.
 - 45) Nemecek T, Fischlin A, Derron J, Roth O.: Distance and direction of trivial flights of aphids in a potato field. *Syst Ecol Rep* 18, 1993.
 - 46) Denancé N, Sánchez-Vallet A, Goffner D, Molina A.: Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Front Plant Sci* 4:155, 2013.

***R*-gene-mediated resistance to plant viruses**

Shuhei MIYASHITA and Hideki TAKAHASHI

Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University
1-1 Tsutsumidori-Amamiyamachi, Aoba-ku, Sendai 981-8555, Japan
E-mail: takahash@bios.tohoku.ac.jp

Most of the reported dominant disease-resistance genes in plants, *R* genes, encode NB-LRR immune receptors. Plant genomes carry many NB-LRR type *R* genes that recognize specific pathogens and induce resistance against them. Thus, this immune system in plants is thought to perform similar functions as the adaptive immune system in animals. In this review, we provide an overview of the resistance mechanisms, evolution, and agricultural applications of *R* genes against plant viruses. We also introduce recent advances in research into the regulatory mechanisms of *R* gene expression, focusing on regulation by microRNAs and introns. One of the most intriguing phenomena that occur following *R* gene-mediated recognition of viruses is programmed cell death around the initial infection site, although its significance in the survival strategies of plants remains to be elucidated. We discuss the possible benefits for plants of inducing such programmed cell death based on our empirical observations and some hypotheses from an ecological point of view.