

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14670

研究課題名(和文) トマト黄化葉巻ウイルスの媒介昆虫特異性決定機構

研究課題名(英文) Transmission mechanisms of Tomato yellow leaf curl virus

研究代表者

宇垣 正志 (Ugaki, Masashi)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：20323438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物DNAウイルスであるベゴモウイルス属ウイルスは200種類以上が知られているが、そのすべてが半翅目昆虫タバココナジラミ種複合体によってのみ植物間を媒介される。その媒介機構を解析し、媒介の可否がコナジラミ中腸円筒細胞へのウイルス粒子の侵入の可否により決定されていること、および、侵入の機構がエンドサイトーシスであることを明らかにし、中腸円筒細胞から作成したcDNAライブラリーを用いて、ウイルス粒子を構成する外被タンパク質と相互作用する遺伝子産物をスクリーニングした。

研究成果の概要(英文)：Begomovirus is a large genus containing more than 200 species of plant DNA viruses, causing serious diseases of cassava, tomato, cotton, bean and so on. Interestingly, the viruses belonging to this genus are transmitted from plant to plant by only one group of phloem-sucking hemipteran insects, whitefly *Bemisia tabaci* species complex. We showed that the begomoviruses are transmitted by *B. tabaci* in a circulative manner and that the virus particles can enter the midgut cells of *B. tabaci* but cannot enter the cells of non-vector whiteflies. We further showed that the entry mechanism is one of endocytosis pathways and screened *B. tabaci* midgut gene products interacting with a begomovirus coat protein.

研究分野：植物病理学

キーワード：ジェミニウイルス ベゴモウイルス 媒介昆虫 コナジラミ

1. 研究開始当初の背景

(1) トマト黄化葉巻ウイルス(*Tomato yellow leaf curl virus*: TYLCV)は、中近東で初めて記載されたトマトの重要病原であり、1996年に南西日本に上陸した新興ウイルスである。温暖化により媒介昆虫と共に北上し、すでに東北以南のほぼ全都府県に分布を拡大している。TYLCV がトマトに感染すると、黄化葉巻病を引き起こし、葉の黄化、萎縮、葉巻、植物体の生育不全、着果不良によって、トマト生産に甚大な被害をもたらす。トマトには多くの病原微生物が知られているが、菌類には殺菌剤、細菌には抗生物質、線虫には殺線虫剤が用いられるのに対し、ウイルスには有効な薬剤が知られていない。そこで、媒介昆虫を殺虫剤により駆除する、あるいは、トマトを温室で栽培し周囲を細かいメッシュで覆うことで媒介昆虫と接触させない、という対策がなされているが、温室の温度が高温となり作業環境が劣悪となるなど、多くの問題がおきている。そこで、新たな TYLCV の防除戦略が強く求められている。

(2) この TYLCV をはじめジェミニウイルス科ベゴモウイルス属に属する 200 種類以上のウイルスは、タバココナジラミ(*Bemisia tabaci*) 種複合体によってのみ媒介されることが知られているが、その媒介特異性を決定する機構は不明である。そこで、その機構を明らかにすることは、新たな TYLCV の防除戦略につながる可能性がある。

(3) TYLCV は、タバココナジラミにより永続的に循環型・非増殖性の様式で媒介される。すなわち、感染植物の篩部で増殖した TYLCV は、タバココナジラミの篩部吸汁行動により篩管液とともに口針に入り、食道、フィルターチャンバーを経て中腸に達する。すると何らかの未知の機構によって中腸円筒細胞に侵入し、中腸組織を通り抜けて血体腔に脱出し、血体腔内を移動し、唾液腺の細胞に侵入し、唾液に入り、次の吸汁行動により新たな植物の篩部に感染する。

(4) 代表者らは、媒介昆虫タバココナジラミの中腸細胞内で、TYLCV が小胞様構造の中に存在していることを明らかにした。これは、TYLCV がエンドサイトーシス(EC)により中腸細胞に取り込まれることを示唆している。

(5) 代表者らは、非媒介性コナジラミであるオンシツコナジラミの中腸細胞に TYLCV 侵入できないこと(entry barrier)をすでに明らかにした。これは、TYLCV がタバココナジラミの中腸細胞にのみ侵入でき、他種昆虫の細胞には侵入できないことを示唆しており、ベゴモウイルスの媒介昆虫特異性は、昆虫の中腸細胞への侵入のステップにより決定されている可能性を示唆している。

2. 研究の目的

TYLCV の媒介昆虫特異性の分子機構を明らかにすることを最終的な目的とする。世界中にコナジラミは約 1,500 種類が知られているが、ベゴモウイルス属ウイルスは、それらのうちタバココナジラミによってのみ媒介され、他のコナジラミによっては媒介されない。この際立った媒介昆虫特異性の分子機構を解明することにより、ベゴモウイルスに対する新規な防除戦略の開発につながる知見を得る。

(1) TYLCV はどのエンドサイトーシス機構を利用して媒介昆虫細胞に侵入するのか：エンドサイトーシス(EC)の機構としてクラスリン仲介型、カベオラ仲介型など複数知られており、動物ウイルスでは、ウイルスの種類により異なる機構を用いて宿主細胞に侵入する。植物ウイルスでは、イネ萎縮ウイルスがクラスリン仲介型 EC を用いてヨコバイ培養細胞に侵入することが報告されているが、他のウイルスでは報告されていない。そもそもコナジラミの中腸細胞にどのような EC 機構が存在するのかすら報告はない。

(2) TYLCV を認識しエンドサイトーシスを誘導する受容体は何か：動物ウイルスでは、宿主あるいは媒介者の細胞に EC を引き起こす受容体が多く単離されている。植物ウイルスでは、アブラムシに媒介されるルテオウイルスと相互作用するアブラムシタンパク質が報告されているが、受容体であるという実験的証明は無い。キロショウジョウバエやカイコなどゲノム解析が進んでいる他の昆虫種の EST データをみると、昆虫の全身で発現している遺伝子 cDNA の種類は数万種類にのぼる。したがって、その中から目的とする TYLCV 受容体 cDNA を同定することは容易でない。そこで中腸組織をインタクトに取り出し、mRNA を抽出し、多様に富む全長 cDNA ライブラリーを作製し、このライブラリーを用いて、目的とする受容体遺伝子を探索する。

(3) 単離された候補遺伝子が、目的とする TYLCV 受容体遺伝子であるかを確認する：タバココナジラミによって媒介されない変異 TYLCV を作出し、候補遺伝子が野生型 TYLCV と相互作用し、変異 TYLCV と相互作用しないことを確認する。最終的には、TYLCV 受容体候補遺伝子の発現を阻害する RNA interference 誘導核酸分子をタバココナジラミに吸汁させ、当該遺伝子の発現をノックダウンし、TYLCV の中腸細胞への侵入が阻害されるかを見る。

3. 研究の方法

(1) TYLCV のタバココナジラミ中腸細胞侵入はどの経路を用いるのか：

申請者らは TYLCV がタバココナジラミの中腸細胞内にエンドサイトーシス(EC)により侵入することを明らかにした。EC には複数の経路があるが、阻害剤および RNAi を用いて、TYLCV がどの経路を用いているかを明らかにする。

(2) TYLCV を認識する受容体は何か：

タバココナジラミの中腸細胞に発現し、TYLCV 外被タンパク質と相互作用するタンパク質をスクリーニングする。候補 cDNA は、ヘアピン RNA をウイルス粒子と共にコナジラミに吸汁させる RNAi 法により TYLCV の取り込みに関わるかどうかを判定する。

4. 研究成果

(1) タバココナジラミ中腸円筒細胞への TYLCV 侵入経路として EC に着目した。カベオラ・脂質ラフト仲介型 EC により細胞に取り込まれる標識コレラトキシンベータサブユニット (CT-B) およびクラスリン仲介型 EC により細胞に取り込まれる標識トランスフェリン(TF)をそれぞれタバココナジラミに吸汁させ、中腸細胞への取り込みを共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、CT-B の取り込みは 0.16 mM ナイスタチンにより、TF の取り込みは 1.6 mM クロルプロマジンにより、それぞれ特異的に阻害された。

(2) タバココナジラミ中腸円筒細胞への TYLCV 侵入にカベオラ・脂質ラフト仲介型 EC あるいはクラスリン仲介型 EC が関与するか推定するために、各 EC 阻害剤である 0.16 mM ナイスタチンあるいは 1.6 mM クロルプロマジンを、粗精製した TYLCV 粒子とともにタバココナジラミに吸汁させた。中腸内腔から円筒細胞を通り血リンパへ移行した TYLCV は、そのゲノム DNA を nested PCR により脚から検出した。その結果、吸汁 3 時間後では、阻害剤未処理区 (DMSO、純水) およびクロルプロマジン処理区で TYLCV が脚から検出されたものの、ナイスタチン処理区では検出されなかった。一方、吸汁 24 時間後では全ての処理区において脚から TYLCV が検出された。この結果から、0.16 mM ナイスタチンにより TYLCV の中腸から血体腔への TYLCV 移行が一定期間阻害されることが示唆され、TYLCV が脂質ラフト仲介型 EC を用いて中腸円筒細胞へ侵入していることが示唆された。

(3) 全長 0.8 mm と微小なタバココナジラミ (Mediterranean) を約 1,000 頭解剖して中腸組織をインタクトに取り出し、そこから全 RNA を 1.2 ug 得た。SMART 法により完全長 cDNA

を合成して PCR (6 サイクル) で増幅し、PCR 産物を電気泳動した後、1 kbp 以下、1-2 kbp、2-4 kbp、4-6 kbp、6 kbp 以上の 5 段階に分画した。分画した cDNA を再度 PCR (25 サイクル) で増幅したところ、0.2-6 kbp までの cDNA が偏り無く増幅された。増幅した cDNA を yeast two hybrid 法の prey 側ベクターに導入しライブラリーを作成した。bait 側ベクターに TYLCV の外被タンパク質遺伝子を導入し、これ単独で転写活性化能が無いことを確認した。予め bait ベクターを形質転換した酵母 AH109 株に prey のコナジラミ中腸 cDNA ライブラリーを形質転換し、3-AT 濃度を 0 mM、1 mM、3 mM、10 mM に振り分けた選択培地にストリークしたところ、それぞれ 1.35 x 10E5、1.0 x 10E5、1.0 x 10E5、1.0 x 10E5 の独立クローンから 212 個、1 個、0 個、0 個の陽性コロニーが得られた。陽性コロニーを培地に塗布してシングルコロニーを単離し、コロニーから prey ベクターを抽出してシーケンスにより塩基配列を特定した結果、4 種類の受容体候補遺伝子が得られた。各候補遺伝子について、昨年度に確立した RNAi 法によりノックダウンすべく、in vitro で合成したヘアピン RNA を人工篩管液とともにコナジラミに摂食させることで中腸円筒細胞に導入した。現在、ウイルスの中腸円筒細胞への取り込みに及ぼす影響について解析中である。

(4) TYLCV の外被タンパク質のどの領域がタバココナジラミ中腸の受容体と相互作用するかを推定するために、予想される外被タンパク質(271 アミノ酸)の立体構造モデルにおいて粒子外側に位置すると推定された 81-92 番目、87-98 番目、190-201 番目および 197-208 番目のアミノ酸をテトラシステインタグ (Cys-Cys-Xxx-Xxx-Cys-Cys) を含むアミノ酸配列で置換したところ、いずれの変異体も *Nicotiana benthamiana* 植物に対する感染性は保持していたが、190-201 番目および 197-208 番目のアミノ酸を置換した変異体はタバココナジラミによる媒介能を喪失した。今後、これらのアミノ酸がどのような機構で TYLCV のタバココナジラミ媒介に関わっているのかを明らかにする必要がある。

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 1 件)

(1) Kawamoto, H., Suzuki, R., Ugaki, M. and Kawano, S. (2016) Location of gold particles and puncture of tobacco leaf epidermis by particle bombardment. *Cytologia* 81; 455-458 (査読あり)

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 小田訓久, 井上創太, 根津修, 宇垣正志, 鈴木匡(2017) 2b タンパク質をトマトアスパ

ーミーウイルスに置換したラッカセイ矮化ウイルスの *Nicotiana benthamiana* における壊死因子の解析. 日本植物病理学会大会, 岩手県民情報交流センター (岩手県盛岡市, 4月27日)

(2) 田村美里, 井上創太, 宇垣正志, 鈴木匡 (2017) トマトアスパーマイウイルスの *Nicotiana benthamiana* に壊死斑を誘導する因子の解析. 日本植物病理学会大会, 岩手県民情報交流センター (岩手県盛岡市, 4月27日)

(3) Uke, A., Seb, V., Iv, P., Ugaki, M., Natsuaki, K. (2017) Spread of Sri Lankan cassava mosaic virus in Cambodia. Annual Meeting of Phytopathological Society of Japan (AIINA, Morioka City, Iwate Prefecture, April 28)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

宇垣 正志 (Masashi Ugaki)(東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授)

研究者番号: 20323438

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()