

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18646

研究課題名(和文)キュウリモザイクウイルスの宿主適応におけるコドンバイアスの役割の検証

研究課題名(英文) Effects of large-scale synonymous substitutions of Cucumber mosaic virus coat protein gene on viral pathogenicity and fitness.

研究代表者

望月 知史 (MOCHIZUKI, Tomofumi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・講師

研究者番号：30469837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物ウイルスの宿主適応におけるウイルス遺伝子のコドンバイアスの役割を解明するために、大規模な同義置換を導入した変異外被タンパク質(CP)をもつキュウリモザイクウイルス(CMV)の病原性と競争的適応性を調べた。変異CMVでは、宿主植物におけるウイルスRNA蓄積量が減少し、適応性が野生型CMVと比較して減少した。しかしながら、変異CMVを宿主植物で数回継代接種するとRNA蓄積量は回復し、変異CPに1-2個のアミノ酸変異が認められた。CP遺伝子のコドンバイアス改変はウイルスRNAの二次構造を変化させ、それによりウイルス病原性が低下するが、CPのアミノ酸変異によりその病原性は回復すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The effect of large-scale synonymous mutation of the coat protein (CP) gene on Cucumber mosaic virus (CMV) pathogenicity was investigated. We constructed CP mutants of CMV in which all codons of 9 amino acids in the 5'- or 3'-half of the CP gene were replaced by major or minor synonymous codons of monocot or dicot plants without any amino acid changes. When *Nicotiana benthamiana* (Nb) plants were inoculated with each CMV mutant, the viral RNA levels and competitive fitness of all CMV mutants were reduced than those of wild type CMV. To further analyze the evolution of viral genes during host adaptation, these mutants were passage-inoculated in Nb. Viral RNA amounts of almost CMV mutants were restored as same as wild type CMV during 10th-passage. Only 1 to 2 amino acid changes were observed in the mutated CP of the each passaged viruses, indicating that these amino acid changes restored the virulence of the CMV mutants.

研究分野：植物病理学

キーワード：ウイルスゲノム進化 同義置換 病原性 外被タンパク質

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物ウイルスのゲノム変異にはアミノ酸変異を伴う非同義置換とアミノ酸変異を伴わない同義置換がある。アミノ酸変異はウイルスタンパク質の構造や機能を劇的に変化させて宿主因子との相互作用等に直接影響するため、新たな宿主への適応やある宿主における病原性の変化には非同義置換の役割が大きい。したがって、これまでの植物ウイルスゲノムの適応進化に関する研究では非同義置換に着目されたものが多い。一方で、アミノ酸変異を伴わない同義置換は、ウイルスの適応進化にはほとんど影響を及ぼさないサイレントミューテーションと考えられてきた。しかしながら、同義置換であっても、ウイルスゲノム RNA の二次構造の変化やコドンバイアスを変化によりウイルスの病原性を変化させることが分かっている。

(2) 一つのアミノ酸における複数の同義コドンは一様に使われているわけではなく、その使用頻度にかかなりの偏り(コドンバイアス)があり、コドンバイアスは生物種間で異なっている。mRNA のタンパク質コード領域のコドンバイアスは、タンパク質翻訳量や mRNA 安定性に関与している。絶対寄生者のウイルスのコドンバイアスでは、動物ウイルスのポリオウイルスでは、外被タンパク質(CP)遺伝子のコドンバイアスは宿主である動物のコドンバイアスに類似していること、CP 遺伝子のコドンバイアスを非動物型に改変(各アミノ酸残基のコドンを動物で最も使用頻度の低いマイナーコドンに同義置換すること)すると、アミノ酸変異を伴わずともポリオウイルスの病原性、宿主選択圧への適応性、そして、ゲノム変異に対するロバストネスが低下することが知られている。他にも幾つかの動物ウイルスにおいてコドンバイアスの改変によりウイルスの病原性が低下することが報告されており、動物ウイルスの適応・進化において同義置換によるコドンバイアスの変化が重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。

(3) 植物ウイルスの宿主植物への適応・進化においては、ウイルス遺伝子のコドンバイアスは重要ではないとされており、同義置換の場合、ゲノム RNA の二次構造が最も重要と考えられている。ウイルスゲノム RNA の二次構造の変化により、ウイルスタンパク質、ウイルスゲノム RNA のシス配列およびトランス因子、そして、宿主因子との相互作用が変化するため、ウイルスの感染性が変化する。さらに、小球形ウイルスでは、粒子中にウイルス RNA がコンパクトに収納されているため、ウイルス RNA の二次構造の変化によりウイルス粒子化効率が低下すると考えられている。実際に私たちは、メロエス斑点ウイルス(MNSV)の複製酵素遺伝子のコドンを非双子葉型のマイナーコドンに同義置換す

ると MNSV の感染性が喪失することを見いだしたが、それが RNA 二次構造の変化によるのかコドンバイアスの変化によるのか明らかではない。

(4) 単子葉植物と双子葉植物ではコドンバイアスが大きく異なっている。MNSV は宿主範囲が双子葉植物のウリ科に限られており、複製酵素遺伝子のコドンバイアスは双子葉植物に類似している。一方、代表的な球形植物ウイルスの一つであるキュウリモザイクウイルス(CMV)は、単子葉および双子葉を含む 100 科を超える植物に感染できる。単子葉と双子葉植物の両方に感染できる CMV をモデルとすることにより、同義置換による影響をウイルス RNA 二次構造変化とコドンバイアス変化に分離できる。そこで、本研究は、ウイルス遺伝子のコドンバイアスが宿主植物における適応・進化に重要な役割を果たしているという仮説を、CMV をモデルに用いて、実験的に検証する。

2. 研究の目的

CMV の CP 遺伝子のコドンバイアスが宿主植物への適応進化に重要な役割を果たしていることを証明するためには、以下の実験的現象を検証する必要がある。

(I) 野生型、メジャー型(CP 遺伝子のコドンを単子葉あるいは双子葉植物で最も使用頻度の高いメジャーコドンに同義置換)、マイナー型(CP 遺伝子のコドンを単子葉あるいは双子葉植物で最も使用頻度の低いマイナーコドンに同義置換)の 3 種の CMV を宿主植物に混合接種した時に、メジャー型が優占種となる(図 1a)。

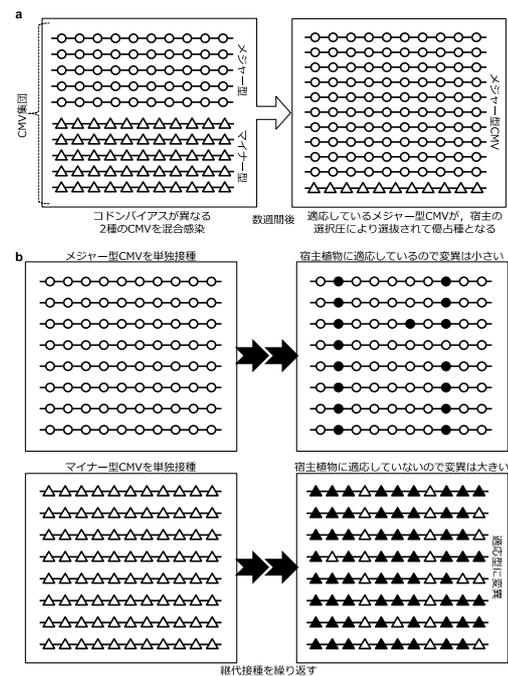


図 1. 植物ウイルス遺伝子のコドンバイアスが宿主植物における適応およびゲノム変異に対するロバストネスに関与していると仮定したときに予想される実験的現象のモデル図。a. 競合実験、b. 継代接種実験。

(II)各 CMV をそれぞれ宿主植物で継代接種した時に、ゲノム変異頻度が最も小さいのはメジャー型 CMV である (図 1b)。

本申請研究では人為的にコドンバイアスを改変した CP をもつ変異 CMV を作出してその病原性を確認し、上記の現象を部分的に検証した。

3. 研究の方法

<変異 CMV の作出>

CP 遺伝子のコドンを、単子葉植物で最も使用頻度の高いメジャーコドン (Mmaj) あるいは最も低いマイナーコドン (Mmin) に置換した変異 CP を設計した。同様に、双子葉植物で最も使用頻度の高いメジャーコドン (Dmaj) あるいは最も低いマイナーコドン (Dmin) に置換した変異 CP を設計した。CP 遺伝子の 20 のアミノ酸のコドンを置換すると感染性が喪失することがすでに分かっていたため、任意の 9 アミノ酸についてコドンを改変した変異 CP 遺伝子を人工合成した。CP 遺伝子全長を改変するとウイルスの全身感染性が顕著に低下したため、CP 遺伝子の前半半分あるいは後半半分領域のコドンバイアスを改変したキメラ CP 遺伝子をもつ 8 つの変異 CMV を作出した (表 1)。

表 1. CMV の CP 遺伝子のコドンバイアス

	codon adaptation index (CAI)	
	単子葉	双子葉
野生型 CP	0.73	0.714
wt/Mmaj	0.781	0.675
Mmaj/wt	0.818	0.65
wt/Mmin	0.653	0.748
Mmin/wt	0.678	0.703
wt/Dmaj	0.694	0.828
Dmaj/wt	0.732	0.781
wt/Dmin	0.714	0.646
Dmin/wt	0.755	0.626

CAI 値が高いと対照生物のメジャーコドンを多く使用していることを示す。

<病原性試験>

8 つの変異 CMV および野生型 CMV の感染性 RNA を in vitro 転写により合成し、*Nicotiana benthamiana* (以下タバコ) に接種した。その後、接種タバコの病徴を観察し、さらに、非接種上位葉におけるウイルス RNA 蓄積量をノーザンブロット法により調べた。

<競合実験>

野生型と変異 CMV の感染性 RNA を 1:1 で混合してタバコに接種した。接種後 2 日目の接種葉、そして、10-14 日目の非接種上位葉から RNA を抽出して CP 遺伝子領域を RT-PCR で増幅し、PCR 産物を野生型あるいは

変異 CMV に特異的な制限酵素で消化し、各ウイルスゲノム RNA の蓄積量を調べた。さらに、同様の実験を変異 CMV 間でも行った。

<継代接種実験>

病原性試験と競合実験により、CP 遺伝子の大規模な同義置換による改変により変異 CMV の病原性が低下することが分かったので、双子葉植物において単子葉型と非単子葉型を継代接種して病原性が回復するかどうかを検討した。Mmaj/wt, Mmin/wt, および、野生型 CMV を用い、1 ライン 3 個体のタバコで独立した 3 ラインの継代接種を行った。接種後 5-10 日目の非接種上位葉を 3 個体から回収して接種源とし、新たな 3 個体に汁液接種する作業を繰り返した。継代 1, 5, 10 日に各接种植物の非接種上位葉から RNA を抽出し、ノーザンブロット法によりウイルス RNA の蓄積量を調べた。また、CP 遺伝子領域を RT-PCR により増幅し、PCR 産物のダイレクトシーケンスにより各継代ラインの CP 遺伝子配列を決定した。

4. 研究成果

<変異 CMV の病原性>

CMV CP 遺伝子の前半領域あるいは後半領域の 9 アミノ酸について、全てのコドンを単子葉で使用頻度の高いメジャーコドン (Mmaj) と使用頻度の低いマイナーコドン (Mmin), そして、双子葉で使用頻度の高いメジャーコドン (Dmaj) あるいは使用頻度の低いマイナーコドン (Dmin), 同義置換した 8 種の変異 CMV (wt/Mmaj, Mmaj/wt, wt/Mmin, Mmin/wt, wt/Dmaj, Dmaj/wt, wt/Dmin, Dmin/wt: 表 1) を作出し、双子葉宿主であるタバコにおける病原性を調べた。全ての変異 CMV は最終的に野生型と同様の病徴を示したが、病徴部位におけるウイルス RNA の蓄積量は野生型と比較して減少していた。特に、後半部分を改変した wt/Mmaj と wt/Mmin (図 2), そして、前半部分を改変した Dmaj/wt, Dmin/wt (data not shown) の RNA 蓄積量が顕著に減少していた。

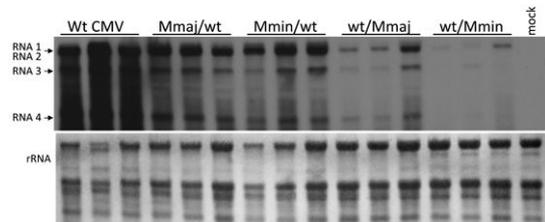


図 2. タバコ非接種上位葉における変異 CMV RNA の蓄積量

Mmaj/wt, Mmin/wt, wt/Mmaj, wt/Mmin は双子葉宿主に対して類似したコドンバイアスを持っている (表 1)。したがって、これらのウイルスの蓄積量はウイルス RNA の二次構造の変化により低下したことで、そして、後半領域の改変がウイルスの病原性に大きく

影響することが示された。同様に, Dmaj/wt と wt/Dmaj, Dmin/wt と wt/Dmin は双子葉宿主に対して類似したコドンバイアスを持っているにもかかわらず(表1),前半領域を改変した変異 CMV の病原性は顕著に減少した。このことから,これらの変異 CMV では前半部分の改変がウイルスの病原性に大きく影響することが示された。

<変異 CMV の競合的適応性>

病原性の低下が比較的小さかった4つの変異 CMV (Mmaj/wt, Mmin/wt, wt/Dmaj, wt/Dmin) について競合的適応性を調べた。各変異 CMV と野生型 CMV の感染性ウイルス RNA を 1:1 で混合してタバコに接種し,接種葉と非接種上位葉における優占種を,制限酵素処理分析により調べた。全ての試験区において,接種葉と非接種上位葉ともに野生型 CMV のみが検出され,変異 CMV の競合的適応度も低下していることが分かった(図3)。双子葉植物において,Mmaj/wt と Mmin/wt は野生型 CP と類似したコドンバイアスを持っているので(表1),Mmaj/wt と Mmin/wt の競合的適応度の低下はウイルス RNA の二次構造の変化によるものと考えられた。

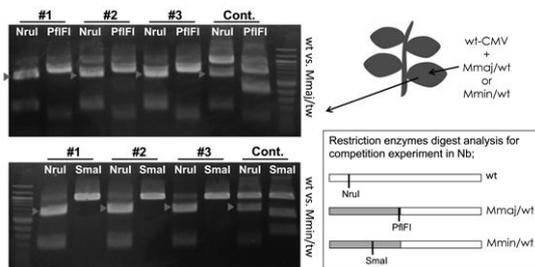


図3. 野生型 CMV (wt) と Mmaj/wt (上) あるいは Mmin/wt (下) を混合接種したタバコの接種葉における優占種調査。混合接種した3個体のすべてにおいて,CP領域を増幅したPCR産物が野生型 CP 特異的な制限酵素 Nru I で消化され,各変異 CP 特異的な PflFI および Sma I で消化されないことから,各変異 CMV の競合的適応度が低下していることが分かる。

さらに,タバコにおける Mmaj/wt と Mmin/wt 間で競合的適応度を解析した結果,接種葉と非接種上位葉ともに両変異 CMV がおよそ同じ蓄積量で存在していることが分かった(図4)。

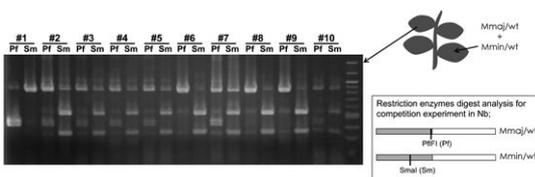


図4. Mmaj/wt (上) あるいは Mmin/wt (下) を混合接種したタバコの接種葉における優占種調査。混合接種した10個体中7個体において,CP遺伝子を増幅したPCR産物が Mmaj/wt 特異的な制限酵素 PflFI と Mmin/wt 特異的な Sma I の両方で消化されていることから, Mmaj/wt と Mmin/wt の競合的適応度はほぼ等しいことが分かる。

一方で, wt/Dmaj と wt/Dmin 間で競合的適応度を解析したところ,タバコに適応したコ

ドンバイアスをもつ wt/Dmaj が優占種となりやすいことが分かった (data not shown)。

<継代接種による変異 CMV の病原性の回復>

タバコにおける病原性が低下していた Mmaj/wt と Mmin/wt について,継代接種により病原性が回復するか,そして,その時に変異 CP の遺伝子配列がどの様に变化するのかを調べた。Mmaj/wt と Mmin/wt,そして,野生型 CMV それぞれについて,各3つのラインで10代目まで継代接種を繰り返し,1,5,10代目におけるウイルス蓄積量をノーザンプロット法で調べた。

継代接種1代目では,Mmaj/wt と Mmin/wt の3ライン全てのウイルス RNA 蓄積量は野生型 CMV と比べて少なかった (data not shown)。継代接種5代目では,Mmaj/wt と Mmin/wt の各3ラインのうち2ラインにおいて,ウイルス RNA 蓄積量が野生型 CMV と同程度まで回復しており,10代目には,Mmin/wt の3ライン全てのウイルス蓄積量が野生型と同程度になっていた(図5)。

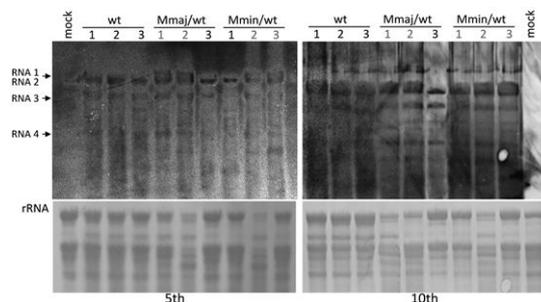


図5. 継代接種5代目(左)と10代目(右)のタバコ非接種上位葉における変異 CMV RNA の蓄積量

継代5代目と10代目におけるCP遺伝子配列をPCR産物のダイレクトシーケンスにより調べたところ,Mmaj/wt と Mmin/wt の3ライン全ての変異 CP 遺伝子に1から2のアミノ酸変異を含む塩基置換が認められた。これらのアミノ酸変異により Mmaj/wt と Mmin/wt の病原性が回復したと考えられた。

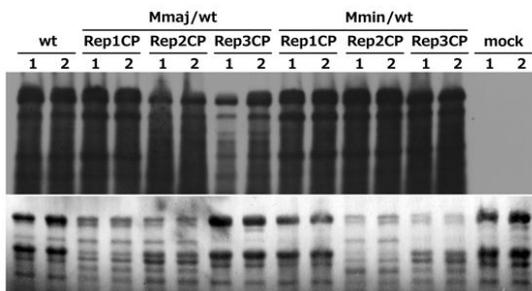


図6. タバコ非接種上位葉における各継代ラインの変異 CP を持つウイルスの蓄積量

一方で,継代ラインの変異 CMV では CP 遺伝子以外にもゲノム変異が起こっている可能性があったので,野生型 CMV クローンの CP 遺伝子領域を各継代ラインの CP と置換し,CP 遺伝子のみ変異を持つクローンを全

ての継代ラインについて作出し (Mmaj/wt-Rep1CP, -Rep2CP, -Rep3CP, Mmin/wt-Rep1CP, -Rep2CP, and -Rep3CP), タバコに接種してウイルス RNA の蓄積量を解析したところ, Mmaj/wt-Rep2CP を除く全てのウイルスが野生型と同程度の蓄積量を示した (図 6)。このことから, 継代ラインの変異ウイルスのウイルス RNA 蓄積量の回復は, CP のアミノ酸変異によって起こることが確かめられた。

以上の結果から, 大規模な同義置換を CP 遺伝子に導入した場合, おそらくウイルス RNA の二次構造の変化により, ウイルスの病原性が低下するが, CP のアミノ酸変異によりウイルス RNA の蓄積量が回復することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Mochizuki, T., Iwamoto, I., Atarashi, A., Ohki S.T., and Kikukawa, H. (2017) Rapid and low-cost diagnosis of *Japanese yam mosaic virus* infection in Chinese yam (*Dioscorea polystachya*) leaves by a print-capture RT-PCR. *J Gen Plant Pathol.* (accepted). 査読有

Mochizuki, T., Nobuhara, S., Nishimura, M., Ryang, B.-S., Naoe, M., Matsumoto, T., Kosaka, Y., and Ohki, S.T. (2016) The entry of cucumber mosaic virus into cucumber xylem is facilitated by co-infection with zucchini yellow mosaic virus. *Arch Virol.* 161: 2683-2692. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

Mochizuki, T. and Roossinck, M.J. Effects of large-scale synonymous substitutions of Cucumber mosaic virus coat protein gene on viral pathogenicity and fitness. The 35th Annual Meeting for the American Society for Virology (Virginia, USA). 2016 年 6 月 18-22 日

Mochizuki, T. and Roossinck, M.J. Recovery of the virulence of large-scale synonymously mutated Cucumber mosaic virus during passage inoculation. 平成 29 年度日本植物病理学会大会 (岩手県盛岡市). 2017 年 4 月 26-28 日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biosci.osakafu-u.ac.jp/MT/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

望月 知史 (MOCHIZUKI Tomofumi)

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・講師

研究者番号: 30469837