

令和元年6月5日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07623

研究課題名(和文) RNA複製酵素活性を阻害するペプチドによる植物ウイルス増殖抑制技術

研究課題名(英文) A new technology for creating plant virus resistance by protein-protein interaction of RNA replicase and genome editing of host factor gene

研究代表者

桑田 茂 (Kuwata, Shigeru)

明治大学・農学部・専任教授

研究者番号：20328967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：植物ウイルスの新しい防除技術の開発を目的として、RNA複製酵素の活性領域に結合するペプチド探索とウイルス増殖に必要な宿主因子を破壊した植物の作出を行なった。キュウリモザイクウイルスRNA複製酵素のメチルトランスフェラーゼ、ヘリカーゼ、ポリメラーゼの各ドメインに結合するランダムペプチド16種類を単離した。また、ゲノム編集によりジャガイモYウイルス(PVY)の感染・増殖に必要なタバコeIF4E1遺伝子の機能破壊タバコを作出した。同タバコはPVYに強い抵抗性を示し、ウイルスが必要とする宿主因子遺伝子を破壊することで抵抗性付与が可能となることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物ウイルスの被害を防止するために、ウイルス遺伝子配列を用いた遺伝子組換え作物が作られている。しかし、ウイルス遺伝子で形質転換した作物は新規のウイルスを生み出しかねないとの懸念などから、実用化されている例は少ない。そこで、ウイルス複製を阻害するペプチド農薬の探索やウイルス複製に必要な植物の宿主因子をゲノム編集によって欠損させた植物の作製を行い、植物ウイルスの被害を軽減化する新技術を開発した。

研究成果の概要(英文)：To develop a new technology for creating plant virus resistance, we searched for peptides that bind to catalytic domains of RNA replicase and created plants that have deletions of a host factor for viral multiplication. We isolated 16 different peptides that bind to methyltransferase, helicase and polymerase domains of cucumber mosaic virus RNA replicase. In addition, genome editing was performed to create tobacco plants with a functional destruction of the tobacco eIF4E1 gene that is required for potato Y virus (PVY) multiplication. The tobacco plants showed strong resistance to PVY, demonstrating that conferring resistance to the virus can be achieved by destroying the host factor gene required by the virus.

研究分野：植物ウイルス学

キーワード：タンパク質-タンパク質間相互作用 植物ウイルス ジャガイモYウイルス キュウリモザイクウイルス
ゲノム編集 植物ウイルス抵抗性

1. 研究開始当初の背景

食料供給の安定化を実現するために多くの植物病害防除技術の開発が行われてきた。化学的防除法において農薬の果たす役割は大きいものの、これまで開発された薬剤のほとんどは糸状菌または細菌に起因する病害に防除効果を示すものであり、ウイルス病を対象としたものは極めて少ない。ウイルス増殖阻害を考えた場合、複製酵素複合体の構成タンパク質間結合を特異的に干渉もしくは阻害することができれば、ゲノム複製を抑えることでウイルス増殖を抑制可能となることからタンパク質-タンパク質間相互作用 (PPI) 阻害は極めてシンプルかつ合理的なアプローチと考えられる。これまでに医薬分野において、PPI 阻害による薬剤開発は創薬化学によりなされ、プロテアーゼ阻害薬、キナーゼ阻害薬での成功を経て、HIV 治療薬や抗がん薬を輩出し、医薬品の進歩に大きく貢献した。一方、農薬開発では低分子化合物によるカップリングなどによって酵素活性中心を阻害するといったアプローチが主流であり、PPI 阻害という戦略で成功した事例はない。近年、ペプチド合成技術の技術革新により生理活性ペプチドや抗菌ペプチドを用いた様々な研究が活発に行われるようになってきた。医療分野では標的分子認識能を示すペプチドの創製技術やオリゴペプチドからなる細胞膜透過ペプチドなどを用いたドラッグデリバリーシステム、非細胞傷害性(非侵襲性)のナノバイオツールなどの研究が盛んに行われている。基礎研究においても一本鎖抗体や Peptide aptamers といった技術が開発され、基礎から応用分野まで幅広く利用されるようになってきた。動物ウイルスでは二本鎖 DNA ゲノムを持つ B 型肝炎ウイルスやヒト乳頭腫ウイルスにおいて、植物ウイルスでは一本鎖 RNA ゲノムを持つトマト黄化葉巻ウイルスにおいて、Peptide aptamers 技術を用いたペプチドによるウイルス増殖阻害に成功した事例がある。しかし、植物ウイルスの大部分を占める一本鎖 RNA ウイルスに対する PPI 阻害ペプチドの研究例は全くない。また、急速に利用が広がっているゲノム編集技術を利用したウイルス抵抗性植物の作出の成功例は報告されていない。

2. 研究の目的

近年、脚光を浴びる生物的防除法は菌類・細菌に対するものが多く、ウイルス病に効果を示すものは弱毒ウイルスによる防除法に留まるのが現状である。また、病害抵抗性育種では対象病害に対し抵抗性遺伝子が存在するものに対しては効果を発揮するものの、抵抗性遺伝子が存在しないあるいは見つからない病害に対しては無効であり、有効な防除手段は確立されていない。そこで、一本鎖 RNA ウイルスの複製を抑えるために RNA 複製酵素に対する PPI 阻害ペプチドを探索してペプチド農薬として利用することを目的とする。ペプチドはサイズも小さく、タンパク質として植物に発現させることが容易であり、基本的な分子生物学的手法により病害抵抗性植物の作出を行うことができる。また近年、ペプチド化学合成が安価となり、膜貫通ペプチドとの融合により細胞外から植物細胞に外部から与えることも可能となってきたことから、非組換え植物としての病害防除技術となりうる可能性も有している。

ウイルス抵抗性植物の作出には遺伝子組換えによりウイルス遺伝子導入する方法が一般的であるが、遺伝子組換えしたウイルス遺伝子が他のウイルスに組換えられて新規のウイルスが出現する恐れがあるために普及していない。植物ウイルスに対する宿主の劣性抵抗性遺伝子(宿主因子遺伝子)の存在はポティウイルス属で知られている。そこで、遺伝子をゲノム編集によってウイルスが必要とする宿主側の宿主遺伝子を破壊することでウイルス抵抗性植物を作出する新技術を構築する。

3. 研究の方法

(1) CMV RNA 複製酵素機能推定領域に結合する人工ペプチドの探索：酵母ツーハイブリッド系の bait としてメチルトランスフェラーゼ様領域、ヘリカーゼ様領域、ポリメラーゼ様領域をそれぞれ MET, HEL, POL と名付け、DNA-BD/bait 発現ベクター(Clontech 社製)を作製した。また、TGxxxTxxxNT モチーフと GDD モチーフの両モチーフを含む領域を GDD 領域と名付け、この領域についても DNA-BD/bait 発現ベクターを作製した。CMV-Y 系統の RNA1 cDNA または RNA2 cDNA を鋳型として各領域を PCR により取得した。これらの形質転換プラスミドを pGBKT7-CMV シリーズとし、インサートに応じて pGBKT7-MET, pGBKT7-HEL, pGBKT7-POL, pGBKT7-GDD と名づけた。

また、MET, HEL, POL については作製した pGBKT7-CMV シリーズから pGADT7 ベクターにも導入した。HEL, POL については pGBKT7-CMV から制限酵素処理 (BamH I, EcoR I) によりインサートを切り出し、同じく制限酵素処理を行った pGADT7 ベクターと T4 DNA Ligase (TaKaRa 社製) を用い連結した。MET についてはインサート内に EcoR I サイトを含むため、新たにプライマーを作製し、pGBKT7-CMV シリーズ作製時と同手順で pGADT7 ベクターへ導入した。これらの形質転換プラスミドを pGADT7-CMV シリーズとし、インサートに応じて pGADT7-MET, pGADT7-HEL, pGADT7-POL と名づけた。ランダムペプチドライブラリーとして Matchmaker Random Peptide Library (Clontech 社製) を使用した。これは、AD/prey 融合タンパク質発現ベクターとして pGAD GH が用いられ、prey 遺伝子として 16 アミノ酸に対応する様々な塩基配列のインサートを含んでいる。このライブラリーは形質転換大腸菌株として保存されているため、添付のマニュアルに従って大腸菌溶液からライブラリープラスミドを回収した。ライブラリーの力価を測定した後、1プレートに 20,000~50,000 コロニーが培養されるように菌液量を薄め、Amp 添加培地約 100 枚に菌

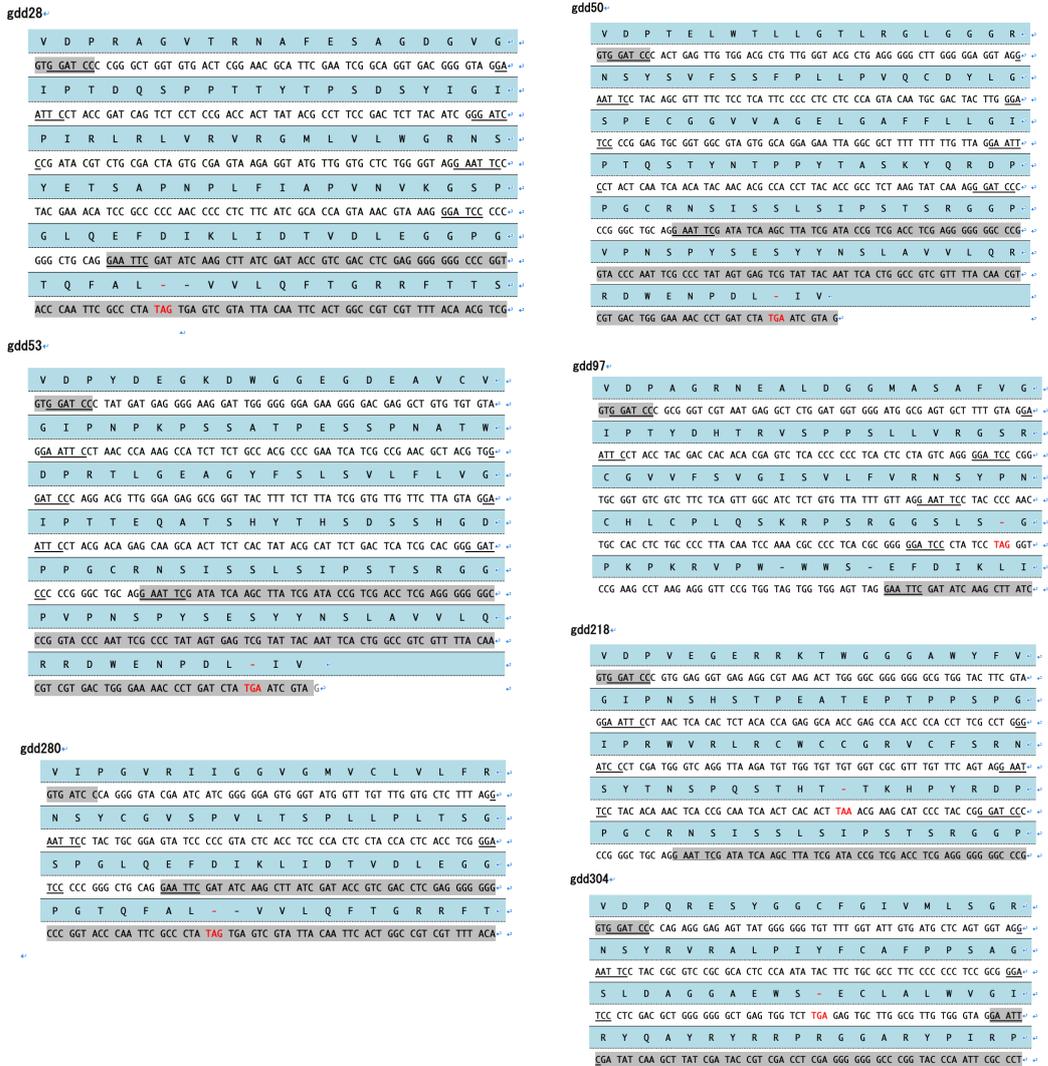


図1. ペプチドの塩基配列とアミノ酸配列。インサートの上流にある BamH I サイトからインサートの下流にある EcoR I サイトまで、あるいはベクター由来の終止コドンまでを記した。灰色で網掛けした塩基配列はベクター由来の配列、赤文字の配列は終止コドンを示す。また、下線は BamH I, EcoR I の制限酵素サイトを示す。

今回得られた結合性ペプチドの多くは 50 アミノ酸以上であり、最も長いものでは 129 アミノ酸であったことから、結合性ペプチドは 16 アミノ酸以上の長さが必要であると考えられた。唯一、po15 は 7 アミノ酸という短いペプチドであった。これは、GAL4 DNA-BD と導入されたペプチド配列の間に存在するスペーサーのアミノ酸配列を含んだ領域で、酵素機能推定領域に結合している可能性がある。これらの結果から、16 アミノ酸程度の短いペプチドでは複製酵素の活性推定部位には結合することができず、ペプチド農薬としての使用は困難と考えられた。また、ランダムペプチドのスクリーニングでは BD や AD の配列の影響も無視できなかった。ベクターを交換する実験では得られたペプチドと複製酵素標的部位の結合は認められなかった。これらの結果から本実験系では複製酵素活性推定領域に短鎖のペプチドで結合するものは見いだすことはできないと考えられた。

(2) ゲノム編集によるジャガイモ Y ウイルス (PVY) 抵抗性タバコの作出

Feature ID	Sequence
S10760	TGGATGAATCTGAGATACCGCTCGTATTGGCAAAAGAAAT
T021287	TGGGGGAATCAGACGATACCGCTTCGCAATTGACAAAGAAAT
T021658	TGGGGGAATCAGAATACCGCTCGTATTGACAAAGAAAT
T025160	TGGGGGAATCAGACGATACCGCTCGTATTGACAAAGAAAT
S05588	TGGGGGAATCAGACGATACCGATTCGCTTTAGGGAACCCAAG
T015277	TTATAGAATCGGAGATACCGATTCGCTTTAGGGAACCCAATG

Arazoe et al. (2015) により作製された糸状菌用にコドン使用頻度を合わせた合成 Cas9 遺伝子と植物で gRNA を発現するためにシロイヌナズナ U6-2 プロモータを pBI121 にクローニングして植物形質転換用の CRISPR/Cas9 ベクターを構築した。このベクターに gRNA としてタバコゲノム内に 6 つ存在する eIF4E 遺伝子群の中から eIF4E1 遺伝子 (S10760) のみを特

異的に破壊可能となるように gRNA を選択し、CRISPR/Cas9 ベクターに導入した (図 2, 3)。

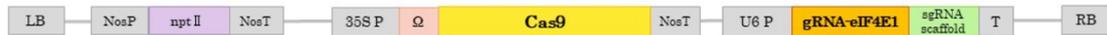


図 2. タバコ eIF4E 遺伝子群の塩基配列比較 (赤字は PAM 配列)

図 3. タバコ eIF4E1 遺伝子破壊用 CRISPR/Cas9 ベクターの模式図

アグロバクテリウム法でこのコンストラクトをタバコに形質転換したところ、eIF4E1 遺伝子内の Cas9 切断部位に 1 塩基 (A) が挿入されたヘテロ個体が得られた。自殖種子を播種して、劣性ホモ個体をゲノム塩基配列決定によって選抜した。この劣性ホモ系統に PVY-T を接種したところ、接種後 6 日目に野生株では上位葉に葉脈透化の病徴がみられたが、劣性ホモ系統は全く無病徴であった。その後、野生株では PVY-T 特有の葉脈壊死が顕著となるのに対し、劣性ホモ系統はほぼ無病徴であった。以上の結果から、ウイルスが複製などに必要とする宿主因子遺伝子をゲノム編集技術により破壊することでウイルス抵抗性植物の作出に成功した。

<引用文献>

- 1) Takayuki Arazoe, Kennosuke Miyoshi, Thoru Yamato, Tetsuo Ogawa, Shuichi Ohsato, Tsutomu Arie, Shigeru Kuwata (2015) Tailor-made CRISPR/Cas system for highly efficient targeted gene replacement in the rice blast fungus. *Biotechnology and Bioengineering* DOI 10.1002/bit.25662.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- 1) Shigeru Kuwata (2018). Studies on the mechanisms of pathogenic changes of plant viruses. *Journal General Plant Pathology* 84:437-440.
- 2) 桑田茂 (2018) 植物ウイルスの病原性変異機構に関する研究. *日本植物病理学会報* 84:139-142.
- 3) Osamu Mizutani, Takayuki Arazoe, Kenji Toshida, Risa Hayashi, Shuichi Ohsato, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Shigeru Kuwata, Osamu Yamada (2017). Detailed analysis of targeted gene mutations caused by the Platinum-Fungal TALENs in *Aspergillus oryzae* RIB40 strain and a ligD disruptant. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 123: 287-293.
- 4) Shigeru Kuwata (2016). Plant viral translation strategies and disease resistance conferred by recessive host genes. *Journal General Plant Pathology* 82:318-322
- 5) 桑田茂 (2016). 植物ウイルスのタンパク質翻訳戦略と抵抗性について. *日本植物病理学会報* 82:149-152.

[学会発表] (計 10 件)

1. 太田光祐, 富田健一, 前田一行, 桑田茂, 大里修一, 二分子蛍光補完法を利用したイネいもち病菌における細胞膜透過ペプチド評価法の構築, 平成 31 年度日本植物病理学会大会, 2019 年 3 月 19 日
2. 木口歌菜, 田中寿樹, 荒添貴之, 佐久間哲史, 山本卓, 桑田茂, 大里修一, イネいもち病菌の相同組換え関連遺伝子破壊株における DNA リセクション反応検出系の構築に向けて, 平成 30 年度日本植物病理学会九州部会, 2018 年 11 月 7 日
3. 西橋潤, 近藤聡, 大音徳, 太田邦史, 桑田茂, 大里修一, ゲノム改変技術によるサトウキビの育種について, 日本植物病理学会九州部会, 沖縄県立博物館・美術館, 2017 年 11 月 8 日
4. 酒井皓大, 三宅駿史, 栗原美樹, 近藤聡, 村本伸彦, 光川典宏, 大音徳, 太田邦史, 桑田茂, 大里修一, 新規ゲノム改変育種技術を用いたイネ耐病性系統取得の試み, 日本植物病理学会九州部会, 沖縄県立博物館・美術館, 2017 年 11 月 8 日
5. 富田健一, 太田光祐, 桑田茂, 大里修一, 膜透過性ペプチドを用いたイネいもち病菌への EGFP 送達と経路, 日本植物病理学会関東部会, 横浜国立大学 教育文化ホール, 2017 年 9 月 23 日
6. Takayuki Arazoe, Thoru Yamato, Ai Handa, Kennosuke Miyoshi, Shuichi Ohsato and Shigeru Kuwata, 「CRISPR/Cas9 system for genome editing in filamentous fungi」, 4th Japan-Korea Joint Symposium on Plant Pathology & KSP Annual Meeting International Convention Center Jeju, Korea, 2017 年 9 月 12 日
7. 飯田藍, 大和澄, 荒添貴之, 大里修一, 桑田茂, CRISPR/Cas9 システムを利用した相同組換えによる多重遺伝子同時改変の試み, 平成 29 年度日本植物病理学会大会 岩手県民情報交流センター, 盛岡市, 2017 年 04 月 27 日

8. 木口歌菜、田中寿樹、國吉真史、荒添貴之、佐久間哲史、山本卓、桑田茂、大里修一、イネいもち病菌 RecQ helicase MUSN の DNA 修復機構への関与、第 17 回 糸状菌分子生物コンファレンス 2017、佐賀市立東与賀文化ホール、2017 年 11 月 16 日
9. 富田成美、小川哲央、荒添貴之、桑田茂、草野好司、大里修一、「イネいもち病菌の相同組換え修復に関与する SRS2 複合体の相互作用領域」、平成 28 年度日本植物病理学会関東部会、神奈川県、2016 年 09 月 30 日
10. 太田光祐、富田健一、桑田茂、大里修一「膜透過性ペプチド Penetratin とイネいもち病菌へのタンパク質の直接導入法」平成 28 年度日本植物病理学会関東部会、神奈川県、2016 年 09 月 30 日

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：大里修一

ローマ字氏名：OHSATO, Shuichi

所属研究機関名：明治大学

部局名：農学部

職名：専任講師

研究者番号（8 桁）：30533228