

令和元年5月29日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18660

研究課題名(和文)植物ウイルス/ウィロイドを標的とするケミカルバイオロジー：化学農薬の開発に向けて

研究課題名(英文)Chemical biology approach to discover inhibitors of plant virus/viroid.

研究代表者

岡野 夕香里 (OKANO, Yukari)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任研究員

研究者番号：90734872

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)：タバコ培養細胞のプロトプラストから液胞を除いて得られる抽出液(BYL)を用いて、potato virus X (PVX)の試験管内翻訳・複製系の構築に成功した。この系に基づく解析により、ウイルス抵抗性遺伝子JAX1は、PVXの複製酵素を含む巨大複合体にターゲティングすることによりPVXの複製を阻害することが示唆された。この系はウイルス複製を阻害する分子のメカニズム解明に直接的に寄与するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PVXが属しているポテックスウイルス属は農業上被害の大きい種を含んでいるが、当属の試験管内翻訳・複製系はこれまで構築されておらず、初めての報告である。この系を構築したことにより、ウイルスの複製反応過程および複製反応を阻害する分子の機能メカニズムを詳細に解析することが可能となった。これにより、今後効果が高いウイルス防除法の確立に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：An in vitro translation/replication system of potato virus X (PVX) using vacuole- and nucleus-free lysates (BYL) from tobacco protoplast was developed. Analyses based on this system suggested that an antiviral resistance gene JAX1 inhibits PVX replication by targeting the huge complex of viral replicase. This system directly contributes to mechanism elucidation of potential inhibitors of plant virus replication.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物ウイルス

1. 研究開始当初の背景

植物ウイルスおよびウイロイドは農作物に感染して病気を引き起こし、品質および生産量を低下させ、世界中で農業生産に甚大な被害を与えている。その被害は全作物生産量の10%以上にも達すると言われ、局所的にはさらに深刻な被害を与えていると考えられる。従って、ウイルス病およびウイロイド病の防除は農業生産において喫緊の課題である。植物ウイルスおよびウイロイドは、単一細胞内における複製、隣接細胞への移行、篩管流を介した全身組織への移行という段階を経て植物へと感染する。植物はそれに対して複数の抵抗性機構を備えている。ウイルス抵抗性機構としてよく知られているのが、ウイルス由来の病原性因子(エフェクター)を植物の抵抗性遺伝子産物(Rタンパク質)が認識することにより開始されるETI(effector-triggered immunity)である。ETIにおいては、初期感染細胞で迅速に細胞死が誘導されウイルスが封じ込められる[Nature, 2006, 444: 323-329]。また、RNAサイレンシングも代表的なウイルス/ウイロイド抵抗性機構として知られている[Cell, 2007, 130: 413-426; Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 3275-3280]。RNAサイレンシングは、細胞内に侵入したウイルス、ウイロイドなどの異常なRNAを認識し、配列特異的にRNAを分解する機構である。現在、このような抵抗性機構を利用し、Rタンパク質を導入した遺伝子組み換え植物やRNAサイレンシング機構を利用した弱毒ウイルスなどの防除法の開発が試みられているが、遺伝子組み換え植物に対する世論は厳しく、弱毒ウイルスも適用ウイルス種が限られている。一方、植物病原性の菌類や細菌に対しては、化学農薬が非常に有効な防除方法となっている。しかし、ウイルスおよびウイロイドは生きた宿主植物の細胞内でしか増殖できない絶対寄生性であり、人工的に培養できないため、菌類や細菌に対して通常行われるような農薬スクリーニングを行なうことはできず、これまでに有効な化学農薬は開発されていない。以上より、現在の所、ウイルス病、ウイロイド病の防除法としては抵抗性品種の利用や媒介昆虫の駆除など、限られた方法しか存在しない。しかし、抵抗性品種の開発には長い時間を要し、抵抗性素材の数も限られている。一度病気が発生すると、感染植物の伐採・除去が蔓延を食い止める唯一の手段である。

近年、ケミカルバイオロジーが新しい研究分野として勃興しつつある。ケミカルバイオロジーは、「化学的観点から生命現象を解明する新しい学問分野」と定義され、狭義には核酸やタンパク質といった生体高分子と特異的に相互作用する低分子化合物をプローブとして、生体高分子の機能を解明するアプローチを指している[日薬理誌, 2008, 132: 4-6]。これに基づき、種々多様な化合物を含む化合物ライブラリーを用いて、ある表現型の変化に着目してスクリーニングを行うことにより、その表現型の原因となる遺伝子を特定することが可能である。近年、動物ウイルスの研究分野では、ケミカルバイオロジーに基づいた手法により、ヒトのC型肝炎ウイルスやポリオウイルスの複製を抑制する化合物が発見され、その作用メカニズムが明らかにされた[Rev Med Virol, 2007, 17: 245-252; J Virol, 2011, 85: 2364-2372]。しかしながら、植物ウイルスやウイロイドの研究においては、ケミカルバイオロジーに着目した研究は行われていなかった。

2. 研究の目的

植物ウイルスおよびウイロイドは農業生産に甚大な被害を及ぼすが、両者は絶対寄生性で培養ができないため、菌類や細菌に対して通常行われるような農薬スクリーニングを行なうことはできず、これまでに有効な農薬は開発されていない。そこで、近年勃興しつつあるケミカルバイオロジーの観点から、ウイルスまたはウイロイドの増殖を阻害する分子を特定すること、そのための効率的実験系の確立を目的とした。

3. 研究の方法

タバコ BY-2 培養細胞のプロトプラストからパーコールを用いた密度勾配遠心によって液胞および核成分を除いて得られる抽出液(脱液胞化タバコ BY-2 培養細胞抽出液; BYL)を抽出した。このBYLにポテックスウイルス属のPVXのRNAを加えて翻訳・複製反応を行った後、複製酵素およびゲノム新生鎖の検出を行った。複製複合体前駆体はスクロース密度勾配遠心とBN-PAGEにより検出した。

4. 研究成果

BYLを用いてPVXの試験管内翻訳・複製系の構築を試みた。BYLにPVXのRNAを加え、翻訳反応を行ったところ、PVXゲノムにコードされる複製酵素が検出された。この複製酵素翻訳後のBYLにRNA合成基質を加えて反応させたところ、新生鎖RNAの合成が確認された。これにより、PVXの試験管内翻訳・複製系の確立に成功した。

この系を用いて、ポテックスウイルス属ウイルスの増殖を阻害することが明らかとなっているシロイヌナズナ由来の抵抗性遺伝子JAX1について、その詳細な機能メカニズムの解析をおこなった。その結果、JAX1はBYL内で、ウイルスの複製酵素の翻訳は阻害しないが、ウイルスの複製を阻害することが明らかとなった。

次に、複製酵素の翻訳後に形成される複合体（複製複合体前駆体）に JAX1 が与える影響を解析した。膜成分を除いた BYL の画分中で、PVX の複製最小単位（レプリコン）の RNA を用いて、試験管内翻訳複製反応を行ったところ、PVX の複合体前駆体は 1,000 kDa を超える複合体であることが分かった。JAX1 存在下で複製複合体前駆体を検出すると、JAX1 が野生型 PVX レプリコンの複合体前駆体にはターゲティングするが、JAX の抵抗性を打破する PVX のレプリコンの複合体前駆体にはターゲティングしないことが示された。以上から、JAX1 は PVX の複製酵素を含む、複製複合体前駆体にターゲティングすることにより PVX の複製を阻害することが示唆された。本研究で確立された PVX の試験管内翻訳・複製系はウイルス複製を阻害する分子のメカニズム解明に直接的に寄与するものである。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

- (1) Yoshida T., Shiraishi T., Hagiwara-Komoda Y., Komatsu K., Maejima K., Okano Y., Fujimoto Y., Yusa A., Yamaji Y., Namba S.
The plant noncanonical antiviral resistance protein JAX1 inhibits potexviral replication by targeting the viral RNA-dependent RNA polymerase.
Journal of Virology 93:e01506-18
2019
DOI: 10.1128/JVI.01506-18
- (2) Nijo T., Okano Y., Kondo M., Okuhara H., Sekimura H., Fujimoto Y., Hosoe N., Maejima K., Yamaji Y., Namba S.
Complete genome sequence of a Lily virus X isolate from Japan.
Genome Announcements 6:e01462-17
2018
DOI: 10.1128/genomeA.01462-17
- (3) Kitazawa Y., Iwabuchi N., Himeno M., Sasano M., Koinuma H., Nijo T., Tomomitsu T., Yoshida T., Okano Y., Yoshikawa M., Maejima K., Oshima K., Namba S.
Phytoplasma-conserved phyllogen proteins induce phyllody across the Plantae by degrading floral MADS domain proteins.
Journal of Experimental Botany 68: 2799-2811
2017
DOI: 10.1093/jxb/erx158
- (4) Koinuma H., Nijo T., Iwabuchi N., Yoshida T., Keima T., Okano Y., Maejima K., Yamaji Y., Namba S.
First complete genome sequence of Cherry virus A.
Genome Announcements 4(3):e00498-16
2016
DOI: 10.1128/genomeA.00498-16
- (5) Tomomitsu T., Kitazawa Y., Netsu O., Nijo T., Koinuma H., Iwabuchi N., Okano Y., Hirata H., Maejima K., Yamaji Y., Namba S.
First report of bacterial black spot on calanthe (*Calanthe* spp.) caused by *Burkholderia andropogonis* in Japan.
Journal of General Plant Pathology 82: 220-223
2016
DOI: 10.1007/s10327-016-0658-7

[学会発表](計4件)

- (1) 藤本祐司・吉田哲也・白石拓也・薦田(萩原)優香・小松健・岡野夕香里・徳田遼佑・前島健作・山次康幸・難波成任
JAX1 によるポテックスウイルス増殖阻害の in vitro 再構成
平成 31 年度日本植物病理学会大会
2019 年
- (2) 吉田哲也・薦田(萩原)優香・藤本祐司・徳田遼佑・西川雅展・岡野夕香里・前島健作・山次康幸・難波成任
ポテックスウイルス複製複合体前駆体への JAX1 のターゲティング
平成 31 年度日本植物病理学会大会

2019 年

- (3) 藤本祐司・二條貴通・岡野夕香里・近藤正剛・奥原宏明・細江尚唯・橋本将典・前島健作・山次康幸・難波成任
国内のユリから検出されたユリ X ウイルスの全ゲノム解析
平成 30 年度日本植物病理学会大会
2018 年

- (4) 鯉沼宏章・二條貴通・岩淵望・吉田哲也・桂馬拓也・岡野夕香里・前島健作・山次康幸・難波成任
チェリー-A ウイルスの全ゲノム解読
平成 28 年度日本植物病理学会関東部会
2016 年

〔図書〕(計 0 件)
なし

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
なし

取得状況 (計 0 件)
なし

〔その他〕
ホームページ等
<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/ae-b/planpath/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。