

令和 2 年 7 月 5 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08159

研究課題名(和文) 農業害虫の抗ウイルス反応を阻害するウイルス因子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of viral factors involved in inhibition of anti-viral reaction in agricultural pests

研究代表者

田中 博光 (TANAKA, Hiromitsu)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・主席研究員

研究者番号：30391577

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)：昆虫体内で感染・増殖しているウイルスは、宿主昆虫のRNA干渉作用を阻害する因子(VSR)を産生することで昆虫体内での抗ウイルス作用を回避している。こうした機能を阻害する技術が開発できれば、画期的なウイルス伝播阻止技術となりうる。本研究ではこうした技術開発に不可欠な基礎的知見を得るため、重要な昆虫媒介性植物ウイルスを対象とし、宿主昆虫体内で機能するウイルスVSRの同定および機能解析を目的とした。まずVSRアッセイ系を構築した。次に、本アッセイ系で、複数の植物病原ウイルス由来の核酸にVSR活性があることを示した。現在、RNA干渉反応のどのステップを阻害しているか解析を進めているところである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、昆虫媒介性の植物病原ウイルス病による作物被害を食い止める新規技術開発が求められている。本成果をもとに、媒介昆虫体内でのウイルスVSRの機能阻害技術が確立できれば、媒介昆虫段階でのウイルス増殖が阻害でき、その結果、媒介昆虫からの農作物へのウイルス伝播が阻止され、農作物ウイルス病の発症・まん延を効果的に食い止めることが可能となると考えられる。植物病原ウイルスを媒介する昆虫の抗ウイルス機構解明研究はまだ創成期の段階であることから、本研究成果は当該研究分野の進展にも貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The viruses that infect and propagate in the insect body protect themselves from the host RNA interference-mediated antiviral response by producing factors (VSR). If the technology that inhibits VSR functions could be developed, it could become an innovative virus-transmission inhibiting technology. In this research, in order to obtain the basic knowledge indispensable for such technological development, we identified and characterized viral VSRs that functions in the host insects. First, we constructed the VSR assay system using Drosophila cell line that can identify VSR functions. Next, we found that nucleic acids derived from several phytopathogenic viruses have VSR activity using this assay system. Currently, we are in the process of analyzing which step of RNA interference reaction these VSRs inhibit. Currently, we are in the process of analyzing which step of RNA interference reaction these VSRs inhibit.

研究分野：昆虫科学

キーワード：昆虫媒介性植物病原ウイルス RNA干渉

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

昆虫媒介性ウイルス病による農作物の被害拡大が国内の生産現場で深刻な問題となっている。こうしたウイルス病の対策として、主に化学薬剤や物理的手法による媒介昆虫の防除、抵抗性品種の導入がなされている。しかし、物理的手法では手間や制限がかかる場合が多く、化学薬剤では抵抗性害虫の発生・蔓延が問題となっている。また抵抗性品種においては対象となるウイルス病が限定されるとともに、抵抗性を打破するウイルスの出現が危惧される。さらに抗ウイルス剤の実用例はなく、ワクチン等の予防薬開発もほとんど進んでいない。それゆえ現状では決め手となるウイルス防除対策はなく、ウイルスに対して卓越した効果のある防除技術が求められている。一方ショウジョウバエや蚊を用いた研究から、宿主昆虫の RNA 干渉 (RNAi) 反応が抗ウイルス作用を示すこと、感染ウイルスはその対抗手段として宿主の RNAi 反応を阻害するタンパク質 (VSR) を発現させ、宿主の抗ウイルス作用を阻止していることが明らかとなっている。さらに、この VSR の機能をウイルス感染昆虫体内で阻害させると、ウイルス増殖が大きく抑制されることも報告されている。そこで、媒介昆虫体内でのウイルス VSR の機能阻害技術が確立できれば、媒介昆虫段階でのウイルス増殖を阻害でき、その結果、媒介昆虫からの農作物へのウイルス伝搬が阻止され、農作物ウイルス病の発症・蔓延を効果的に食い止めることが可能となると考えられる。しかし、昆虫で働く昆虫媒介性植物病原ウイルス由来 VSR の解析については、宿主昆虫が微小のため生化学的な解析が困難等の理由でほとんど進んでいないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、ウイルス媒介昆虫体内のこれらウイルス VSR を標的とするウイルス媒介阻害技術の開発を最終目標とし、本目標達成に必要な基礎的知見を得るため、まずアザミウマ等が媒介し、国内生産現場で大きなウイルス病被害をもたらしているトマト黄化えそ病ウイルス、トビイロウンカが媒介し、ベトナム等で大きなウイルス病被害をもたらす、今後国内での発生・蔓延が危惧されるイネラギットスタントウイルス及びイネグラッシースタントウイルス等の各 RNA ウイルスに着目し、まず VSR の機能を検証できる系をショウジョウバエ由来培養細胞等で確立するとともに、この VSR の機能を検証できる系を用いて、宿主昆虫体内で機能する VSR の探索・同定を行い、さらに同定した VSR の機能解析を行う。

3. 研究の方法

(1) ショウジョウバエ培養細胞を用いた VSR アッセイ系の確立に関わるプラスミドの作製および二本鎖 RNA の合成

ホタルルシフェラーゼ遺伝子およびウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子それぞれにショウジョウバエアクチン A3 プロモーターを連結させたカセット DNA を発現ベクターに挿入させたレポータープラスミド (siCHECHA3A3) を作製した。また、昆虫媒介性植物病原ウイルスから各セグメント DNA をクローニングし、ショウジョウバエ用発現ベクターに挿入したウイルス由来 DNA 発現プラスミドを作製した。ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子由来の核酸配列を有する二本鎖 RNA は、MEGAscript RNAi Kit (Thermo Fisher) を用いて *in vitro* で合成した。

(2) ショウジョウバエ培養細胞へのトランスフェクションおよびルシフェラーゼ活性の測定

培養細胞としてショウジョウバエ由来の schneider2 (S2) 細胞を用いた。S2 細胞は 10% 牛胎児血清を含む Schneider's *Drosophila* medium (Gibco) で培養した。

レポータープラスミド、二本鎖 RNA、ウイルス由来 DNA 発現プラスミドを S2 細胞にトランスフェクション試薬 (FuGENE HD, Promega) を用いてトランスフェクションした。一定時間後に細胞抽出液を調製し、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Progega) を用い、ホタル及びウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した。

(3) 培養細胞での VSR アッセイ系を用いた昆虫媒介性植物病原ウイルス VSR の同定

昆虫ウイルス由来の核酸配列については、DNA 配列としてサブクローニング後、上記(1)に記した通りショウジョウバエ用発現ベクターに挿入したウイルス由来 DNA 発現プラスミドを作製した。これを上記(2)に示したトランスフェクション実験に用い、VSR としての活性があるか検定した。

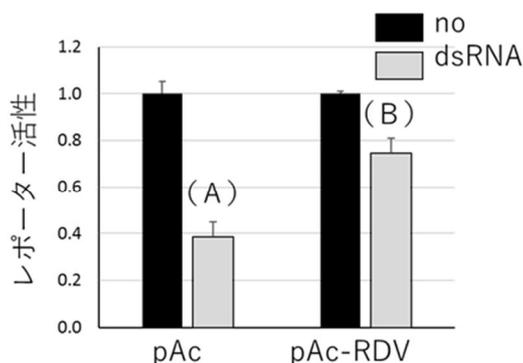
4. 研究成果

(1) ショウジョウバエ培養細胞を用いた VSR アッセイ系の構築

まず、レポータープラスミドを導入し、レポーター遺伝子を発現させた S2 培養細胞にレポーター遺伝子の塩基配列を有する二本鎖 RNA を導入させると、RNA 干渉作用が引き起こされ、標的となるルシフェラーゼ遺伝子の発現（ウミシイタケルシフェラーゼ活性）が抑制することが明らかとなった。次に、ツマグロヨコバイが媒介するイネ萎縮病ウイルス（RDV）において、植物体内で RNA 干渉作用の阻害因子として知られているタンパク質（Pns10）をコードしている DNA を導入した発現プラスミドを、レポータープラスミド、二本鎖 RNA とともに、S2 培養細胞に導入すると、二本鎖 RNA の標的となるウミシイタケルシフェラーゼの活性抑制が解除されることがわかった（図 1）。

図 1 ショウジョウバエ培養細胞内における Pns10 タンパク質のノックダウンの阻害

ショウジョウバエ培養細胞にレポーター遺伝子を標的とする二本鎖 RNA(dsRNA)を導入すると、レポーター遺伝子のノックダウンが起こる (A) が、イネ萎縮病ウイルス(RDV)の Pns10 の発現プラスミドをさらに導入し発現させると、ノックダウンが抑制される (B)。pAc：空の発現プラスミド、pAc-RDV：Pns10 発現プラスミド



これらのことから、この S2 培養細胞に、レポーター遺伝子、二本鎖 RNA とともに、ウイルス由来遺伝子産物を発現する発現プラスミドを導入し、培養細胞中でウイルス由来遺伝子産物を発現させれば、これらが VSR 活性を有しているかを簡便に知ることができることが示された。

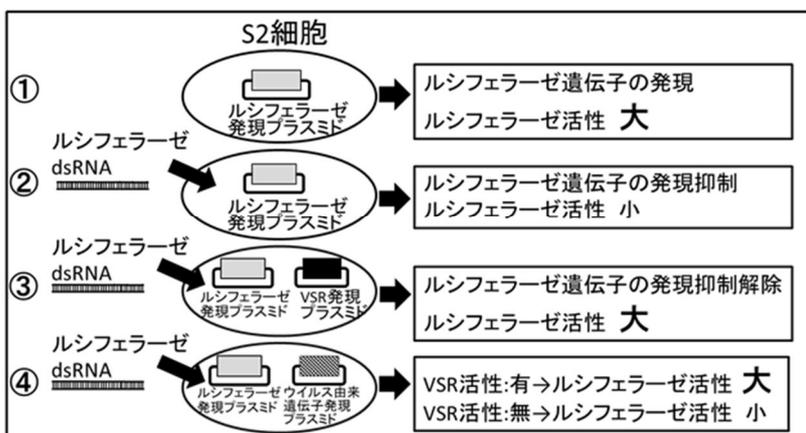


図 2 S2細胞でのVSRアッセイ系

ルシフェラーゼ発現プラスミドとウイルス遺伝子発現プラスミドを導入したS2細胞に dsRNAを導入あるいは発現させ、ルシフェラーゼ活性を測定することでVSR活性の有無を推定できる④。

(2) 培養細胞での VSR アッセイ系を用いた昆虫媒介性植物病原ウイルス VSR の同定

次に、本アッセイ系を用いて、トビイロウンカが媒介するイネラギットスタントウイルス（RRSV）、イネグラッシースタントウイルス（RGSV）ヒメトビウンカが媒介するイネ縞葉枯病ウイルス（RSV）由来のウイルスタンパク質に VSR 活性があるかを検定した。その結果、RDV の Pns10 ほどではないが、RGSV や RSV 由来のあるタンパク質において、VSR 活性化あることが示された（図 3）。

さらに、他の複数の植物病原ウイルスにも広げて、これらウイルス由来のタンパク質に VSR 活性があるかを調べた。いくつかのウイルス由来タンパク質においては弱いながらも VSR 活性があることが示された。興味深いことに、ポチウイルス科に属するウイルス由来のタンパク質に高い VSR 活性があることが示された。この活性は、RDV の Pns10 の活性より高かった。

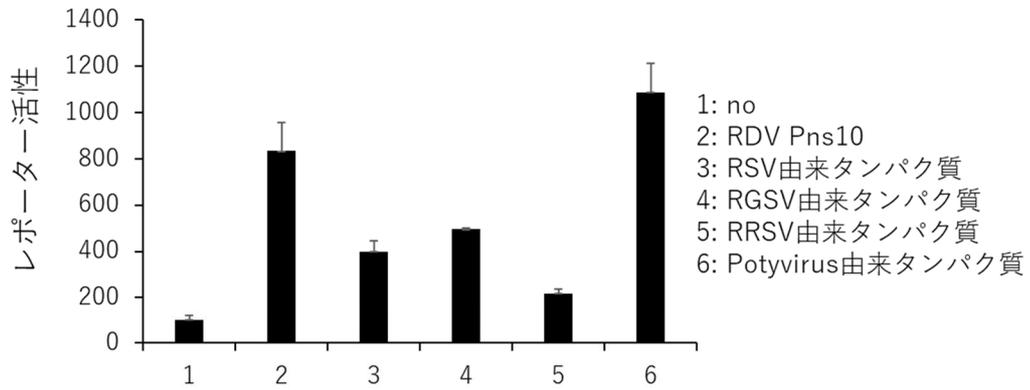


図3 ショウジョウバエ培養細胞内における各種ウイルス由来タンパク質のノックダウンの阻害

ショウジョウバエ培養細胞に、レポーター発現プラスミド、レポーター遺伝子を標的とする二本鎖RNA、ウイルス由来タンパク質発現プラスミドを導入し、レポーター活性の抑制解除を調査した。

(3) 同定したVSRのRNAi経路における作用点の同定

RNAi経路の最初の段階はRNA分解酵素であるDicer2がdsRNAを認識・切断して短いRNA(siRNA)を産生させる反応である。dsRNAの代わりにsiRNAを細胞に処理してもRNAi反応が誘導されるが、もしVSRがこのステップを阻害しているのであれば、siRNA依存的なRNAi活性化に関与しないはずである。そこで、siRNA依存的なRNAi活性化に影響を及ぼすかを調査し、最初のステップの阻害に関わるかを調査するため、現在siRNAを用いてのVSR活性の検定を実施しているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 令和2年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
2. 発表標題 昆虫感染ウイルス、昆虫媒介性植物病原ウイルス由来Viral Suppressor of RNA interference の探索と機能解析
3. 学会等名 勾坂 晶・村上理都子・渡部賢司・田中博光
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	村上 理都子 (Murakami Ritsuko) (10414947)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員 (82111)	