

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06047

研究課題名(和文) ラッカセイ矮化ウイルス病原性機構解明と抵抗性ラッカセイの作出

研究課題名(英文) Analysis of pathogenicity of Peanut stunt virus (PSV) and construction of resistant peanuts against PSV

研究代表者

鈴木 匡 (Suzuki, Masashi)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：40282694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ラッカセイ矮化ウイルス(PSV)側の因子が外被タンパク質(CP)であることを明らかにし、CPを酵母ツーハイブリッド法に用いるプラスミドへのクローニングを行った。

矮化症状が最も激しいラッカセイ品種StarrからcDNAライブラリーを作成し、矮化を誘導するPSV-P1系統のCPと相互作用する因子を探索するため、酵母ツーハイブリッド法によって栄養要求性培地でのスクリーニングをした。

その結果、陽性クローンが70個ほど得られた。現在、その塩基配列を解析中である。新型コロナウイルスによる担当学生の体調不良や研究制限等の影響が排除できず、残念ながら因子を特定までは至らなかったが、さらなる成果が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラッカセイ矮化ウイルスについては、今まで遺伝子解析がされておらず、病原性に関して知見がほとんどなかった。本研究により、ウイルスの外被タンパク質が矮化を誘導する原因であり、ウイルスタンパク質と相互作用するラッカセイタンパク質の存在が強く示唆される重要な知見が得られた。ラッカセイ矮化病の新規抵抗性につながるものが強く期待される。植物のウイルス病抵抗性作物については抵抗性遺伝子の探索と栽培品種への導入、あるいは形質転換植物で成果があるが、本研究のアプローチは、ウイルスに反応する植物の遺伝子を標的とした新たな抵抗性育種につながる意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We identified the PSV factor as the coat protein (CP) and cloned CP into a plasmid for the yeast two-hybrid system.

We prepared a cDNA library from peanut plant (cv. Starr), and screened it on nutrient-requiring medium by the yeast two-hybrid method to search for factors interacting with CP in the PSV-P1 strain that induces stunting.

As a result, about 70 positive clones were obtained. Their sequences are currently being analyzed. Unfortunately, we could not identify the factors due to the effects of COVID-19 on the students' health and research restrictions, but further results are expected.

研究分野：植物病理学

キーワード：ラッカセイ矮化ウイルス ラッカセイ 酵母ツーハイブリッド法 外被タンパク質

1. 研究開始当初の背景

植物ウイルス病による世界の作物生産損失額は年間 5 兆円を超えると試算され、農業の被害は甚大である。しかし、生きた細胞に寄生するウイルスに対する予防や治療に有効な農薬はない。防除は感染植物の廃棄や媒介生物の駆除が主である。ウイルス抵抗性遺伝子を栽培植物に導入してウイルス病を予防あるいは軽減する抵抗性育種法は、残念ながら適用できる作物が限られ、しばしば打破するウイルスが出現するのが難点である。有用な抵抗性遺伝子を異種食異物に導入するためには、遺伝子組換えを用いるが、遺伝子導入時の選抜マーカー遺伝子が環境中へ漏洩する危険がある等様々な問題点が残されている。形質転換による抵抗性付与でも、ウイルスの変異によって抵抗性が打破される例があり、効果は持続的とは言いがたい。このような背景から、従来の抵抗性遺伝子を利用する手法とは異なる、新たな抵抗性植物の作出への基盤技術の確立が強く望まれていた。

近年目覚ましい研究が進む RNA を介した特異的な RNA 分解機構(RNAi、植物では RNA サイレンシング)は、RNA をゲノムに持つ植物ウイルスの増殖を抑制することが明らかとなった。この機構を利用して、ウイルスゲノム RNA 断片を植物に導入して発現させるとウイルス感染前に RNA サイレンシングが発動するために侵入したウイルスが増殖できない強力な抵抗性となるが、一方で、塩基配列特異性が非常に高いために、前述の抵抗性遺伝子と同様に、ウイルスゲノムの塩基変異によって打破される危険が高い。

植物ウイルスは、生きた細胞でしか増殖せず、タンパク質翻訳のほか、複製や細胞間移行に必ずタンパク質などの因子を必要としている。しかし、ウイルス増殖に必要な植物因子は、未だにほとんど解明されていない。タンパク質相互作用解析や次世代シーケンサーによる大規模シーケンシス解析の発展によって、モデル植物以外の植物でも、タンパク質や遺伝子の単離同定が容易になってきているものの、ウイルスタンパク質と相互作用するタンパク質やウイルス感染によって発現が変動する遺伝子は莫大な数にのぼり、機能予測では多岐あるいは不明な遺伝子が多く、ウイルス病徴発現に関わる植物因子の同定は困難である。しかし、これらのウイルス増殖に必要な因子が解明されれば、その因子の発現抑制や標的とした薬剤開発など、新たな抵抗性植物作出へつながらる可能性が極めて高い。

2. 研究の目的

本研究では、抵抗性遺伝子が未報告のウイルスの 1 つであるラッカセイ矮化ウイルス(PSV)に対するラッカセイの矮化病徴を主な材料とし、病徴発現に至る過程の解析と、ウイルス感染植物においてウイルス側の病原因子と相互作用する植物因子を探索・同定し、その植物側因子の相同因子を近縁植物種から単離し、ゲノム編集技術を用いてラッカセイの因子を欠失させ、新たに植物の相同遺伝子を置換導入することで、PSV による矮化病徴が軽減され、ラッカセイの生育には影響を与えないという新たな抵抗性植物の作出を行なうことを目的とする。

3. 研究の方法

(1). ウイルス側因子の特定として、既に申請者らは、PSV-P1 系統によるラッカセイの矮化は、PSV-P1 外被タンパク質(CP)が原因であること、矮化個体では内生ジベレリンの量が特異的に減少していることを明らかにした(高橋ら、2016)。PSV-J 系統 CP ではジベレリンが減少せず矮化しないことから、この両系統のキメラ CP をもつウイルスを作製し、矮化に関与する CP 領域を特定する。これにより、後のスクリーニングの精度が大幅に増すことが期待される。

(2). 矮化する CP (P1-CP)と、矮化させない CP (J-CP)をベイトとして、ラッカセイから相互作用するタンパク質のスクリーニングをする。まずは酵母ツーハイブリッド法によって P1-CP と相互作用する遺伝子産物をスクリーニングする。ここで、(1)で明らかにした矮化させるキメラ CP と矮化させないキメラ CP を用いて検証することで、相互作用の有無によって矮化が誘導されるかどうかを推定可能となる。もしも、相互作用の有無ではない場合も含めて、候補遺伝子を慎重に選抜する。

(3). 候補遺伝子の RNA サイレンシングによる発現量抑制と病徴に対する影響評価として、スクリーニングで得られた、矮化に関与するラッカセイ遺伝子産物の遺伝子塩基配列の一部を 2 本鎖 RNA 発現プラスミドに挿入しアグロインフィルトレーションあるいは、申請者が有するウイルスベクター(Yamagishi et al., 2015)に挿入して RNA サイレンシングにより発現量抑制を行ない、その状態で PSV-P1 を感染させ、矮化病徴軽減への影響を解析する。

(4). 得られた候補遺伝子をゲノム編集によって不活性化させ、ラッカセイの生育や PSV-P1 感染時の矮化等を解析する。

(5). 他マメ科植物(ササゲやインゲンマメ等)から、ラッカセイの矮化に関与する遺伝子産物の相同遺伝子の単離を行う。得られた遺伝子産物は、酵母ツーハイブリッド法等により矮化させる PSV-P1 CP との相互作用を解析し、相互作用しないことを確認する。

(6). 得られた相同遺伝子をゲノム編集ラッカセイへ形質転換し、ラッカセイの生育や PSV-P1 感染時の矮化等を解析する。

4. 研究成果

(1) P1 CP と JCP は全 216 アミノ酸中、30 塩基の相違がある。いくつかのドメインに区切ってキメラ CP を作製するとともに、1 アミノ酸変異体も作製した。その結果、P1 CP の 35 番目のアミノ酸を Ser から Ala に置換すると矮化誘導がおきなくなることが明らかとなった。一方で、JCP の Ala を Ser に置換しても矮化誘導は起きなかった。

(2). P1-CP および J-CP を Matchmaker Yeast Two Hybrid 法のベイトベクターにクローニングした。P1-CP をベイトとし、ラッカセイのうち、矮化症状が最も激しいラッカセイ品種 Starr から cDNA ライブラリーを作成した。ラッカセイの葉からの RNA 抽出では、良い結果が得られなかったため、矮化に重要なジベレリン発現抑制に着目し、ジベレリンが高発現する茎長、および種子から RNA 抽出を行い、cDNA ライブラリーを作成し、P1-CP をベイトとして導入した酵母に計七羽転換したところ、相互作用しないと生育できない -Leu/-Trp/-His 培地で陽性クローンが 70 個ほど得られた。さらに擬陽性を排除するため、-Leu/-Trp/-His/Ade 培地でスクリーニングしたところ、陽性クローンが 50 個ほどとなった。コロニー PCR によって増幅した断片長とその制限酵素切断パターンから重複したものを除き、cDNA の挿入されたプラスミドを大腸菌に形質移転し、塩基配列を解析中である。

新型コロナウイルスによる担当学生の体調不良や研究制限等の影響が排除できず、大幅な研究の遅れから、(3)以降は、計画を立てるのにとどまり、残念ながら期間内に目標達成にはいたらなかったが、今後につながる貴重なデータが得られたと思われる。さらに候補遺伝子の解析を進めて、さらなる研究の発展を目指している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 31.Watanabe, K., Sakane, A., Terada, R., Nishigawa, H., Suzuki, M. and Ugaki, M.	4. 巻 87
2. 論文標題 Construction of monopartite geminivirus-based virus-induced gene silencing (VIGS) vectors using a two-component strategy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JOURNAL OF GENERAL PLANT PATHOLOGY	6. 最初と最後の頁 366-376
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------