

令和 6 年 5 月 4 日現在

機関番号：81202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05604

研究課題名（和文）温度依存的ウイルス増殖を利用したウイルス感染関連因子の迅速解析実験系の確立

研究課題名（英文）Establishment of high-throughput screening system of host factors regulating viral infection by using low temperature-dependent virus multiplication

研究代表者

藤崎 恒喜 (Fujisaki, Koki)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・園芸資源研究部・主任研究員

研究者番号：30626510

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）：本研究では、独自に単離したシクテウォーターボーンウイルスのC1系統のシロイヌナズナにおける低温依存的増殖機構を利用した同調的大規模ウイルス感染発動系を用いて、ウイルス増殖制御因子を順遺伝学的に同定する技術開発を行った。約7万系統のシロイヌナズナ変異株から、200系統以上のウイルス増殖抑制変異候補株を選抜し、そのうち17系統は強いウイルス抵抗性を示した。また、それらの中には複数種のウイルス増殖に影響を与える中核的ウイルス感染制御因子の変異株も含まれることがわかった。遺伝学的解析からは原因遺伝子候補としてeIF4Gを1年ほどで同定するなど、本系の有効性を示す結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルス感染制御のためにはウイルスと植物との相互作用の理解が不可欠である。その解明を目指して遺伝学的・生化学的手法による様々な研究が行われてきたが、まだ十分ではない。本研究では、独自に単離したSWBV-C1の特性を利用したウイルス感染発動系と近年のNGS解析技術を組み合わせることによって、ウイルス感染制御因子を順遺伝学的に大規模解析可能な独自の実験系を構築した。これにより短期間で大量の変異株を少労力で選抜し、原因遺伝子の同定にまで至ることができた。その過程で様々な変異株が得られてきており、それらの解析が進めば、新規のウイルス-植物間相互作用の理解と感染制御技術の開発につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we originally isolated Sikte water born virus strain C1 (SWBV-C1) showing low temperature-dependent multiplication in *Arabidopsis thaliana*. By using SWBV-C1, we established a high-throughput screening system to identify host factors regulating plant virus infection in *A. thaliana* (virus multiplication in planta uniformly and easily starts by temperature shift and estradiol treatment). We screened approximately 70,000 *Arabidopsis* mutants, and isolated more than 200 mutants showing low infectivity of virus multiplication. Some of them inhibited multiple plant virus infection. Seventeen of them showed strong inhibition of virus multiplication, and one of them was caused by the mutation in eIF4G gene. These data suggest the usefulness of this system to identify virus regulating factors. We will further use this system to identify host factor involved in other virus multiplication or plant immune system.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物ウイルス ウイルス制御因子 シロイヌナズナ SWBV-C1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

令和5年5月7日現在

機関番号：81202

研究種目：基盤研究C

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05604

研究課題名(和文): 温度依存的ウイルス増殖を利用したウイルス感染関連因子の迅速解析実験系の確立

研究課題名(英文): Establishment of high-throughput screening system to identify host factors regulating virus infection by using temperature-dependent virus multiplication.

研究代表者：藤崎 恒喜 (FUJISAKI, Koki)

岩手生物工学研究センター 園芸資源研究部 主任研究員

研究者番号：30626510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費)3,400,000円

研究成果の概要(和文): 本研究では、独自に単離したシクテウォーターボーンウイルスの C1 系統のシロイヌナズナにおける低温依存的増殖機構を利用した同調的大規模ウイルス感染発動系を用いて、ウイルス増殖制御因子を順遺伝学的に同定する技術開発を行った。約7万系統のシロイヌナズナ変異株から、200系統以上のウイルス増殖抑制変異候補株を選抜し、そのうち17系統は強いウイルス抵抗性を示した。また、それらの中には複数種のウイルス増殖に影響を与える中核的ウイルス感染制御因子の変異株も含まれることがわかった。遺伝学的解析からは原因遺伝子候補として eIF4G を1年ほどで同定するなど、本系の有効性を示す結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルス感染制御のためにはウイルスと植物との相互作用の理解が不可欠である。その解明を目指して遺伝学的/生化学的手法による様々な研究が行われてきたが、まだ十分ではない。本研究では、独自に単離した SWBV-C1 の特性を利用したウイルス感染発動系と近年の NGS 解析技術を組み合わせることによって、ウイルス感染制御因子を順遺伝学的に大規模解析可能な独自の実験系を構築した。これにより短期間で大量の変異株を少労力で選抜し、原因遺伝子の同定にまで至ることができた。その過程で様々な変異株が得られてきており、それらの解析が進めば、新規のウイルス-植物間相互作用の理解と感染制御技術の開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文): In this study, we originally isolated Sikte water born virus strain C1 (SWBV-C1) showing low temperature-dependent multiplication in *Arabidopsis thaliana*. By using SWBV-C1, we established a high-throughput screening system to identify host factors regulating plant virus infection in *A. thaliana* (virus multiplication in planta uniformly and easily starts by temperature shift and estradiol treatment). We screened approximately 70,000 *Arabidopsis* mutants, and isolated more than 200 mutants showing low infectivity of virus multiplication. Some of them inhibited multiple plant virus infection. Seventeen of them showed strong inhibition of virus multiplication, and one of

them was caused by the mutation in *eIF4G* gene. These data suggest the usefulness of this system to identify virus regulating factors. We will further use this system to identify host factor involved in other virus multiplication or plant immune system.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物RNAウイルス、ウイルス増殖制御因子、順遺伝学、シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

植物ウイルスの感染・発病の様態は様々な宿主因子とウイルス因子との相互作用のもとに成立している。そのためウイルスの感染・発病機構の理解と制御のためには、宿主-ウイルス間相互作用の解明が非常に重要となっている。これまで様々な生化学的、遺伝学的アプローチにより、ウイルス抵抗性因子 (antiviral factor) やウイルス増殖をサポートする宿主因子 (proviral factor) が同定されてきているが、ウイルス感染の全体像を理解するためには不十分であり、植物のハイスループットの実験系の確立が必須となっている。

申請者はこれまで岩手県内のリンドウからシクテウォーターポーンウイルスのC1系統 (SWBV-C1) を同定した。ユニークな特性として SWBV-C1 は低温 (18) ではリンドウおよびシロイヌナズナで効率よく増殖・発病するが、より高温 25~28 以上では1細胞レベルでウイルス感染が顕著に抑制された。申請者は次に SWBV-C1 のユニークな増殖特性を活かして SWBV 感染に関わる宿主因子を同定する実験系の開発に取り組んだ。SWBV-C1 系統の全長ゲノムをエストラジオール誘導プロモーターの制御下で発現させる形質転換シロイヌナズナを作出し、エストラジオールを処理と 18 への温度シフトで SWBV 感染が同調的に発動し、発病に至る実験系を構築した (図1)。

研究の目的

本研究は、SWBV-C1 のシロイヌナズナにおける低温依存的増殖特性を活かし、同調的、高精度、かつ簡便にシロイヌナズナに感染は発動させる実験系の構築と特性評価を行い、順遺伝学的解析によるウイルス増殖制御因子の大規模同定解析に用いることを目的とする。本実験系を用いて得られたシロイヌナズナ変異体からウイルス増殖制御に寄与する原因変異 (及び遺伝子) を同定し、分子レベルでの機能解析の基盤情報とすることで、ウイルス感染機構の理解とその制御技術の開発に向けた研究の端緒とすることを目的とする。

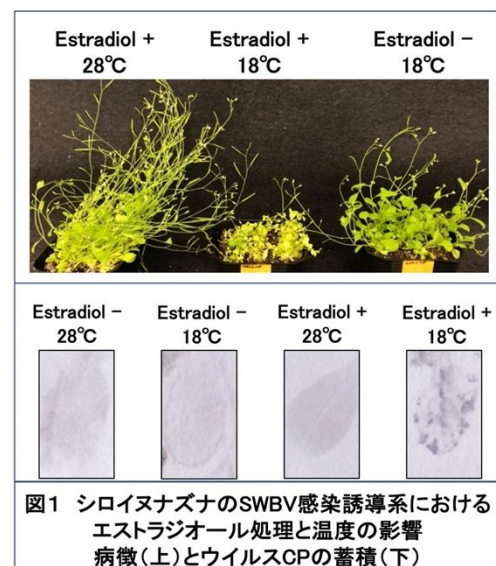


図1 シロイヌナズナのSWBV感染誘導系におけるエストラジオール処理と温度の影響
病徴(上)とウイルスCPの蓄積(下)

2. 研究の方法

(1) 病徴を指標にしたウイルス増殖・発病関連因子の大規模スクリーニング

確立したシロイヌナズナにおける SWBV 感染・発病系を用い、形質転換体の EMS 変異体 (M2 世代) を作出する。それら数万系統以上についてエストラジオール処理と温度シ

フトを組み合わせ、病徴を指標としたスクリーニングを行う。本系においてはSWBV-C1の初期感染拡大が斑点状に観察されるため(図1)、ウイルス移行も最終的なウイルス増殖・発病レベルに大きな影響を与えると考えられる。ウイルスの細胞間以降にも焦点を当てた研究を推進していく予定である。

(2) レポーター遺伝子を利用したウイルス増殖評価系の確立

これまで、SWBVの外被タンパク質(CP)の下流に外来遺伝子を載せられることが確認されている(図2)。そこで、CPにルシフェラーゼ遺伝子(Luc)をつないだSWBV(SWBV-luc)を用いることで、Luc活性を指標にしたウイルス増殖の定量的評価系を構築する。

(3) ウイルス増殖・発病関連因子の単離・同定

同定された変異株を用いて、ウイルス因子とともに、少なくとも3つ以上の宿主遺伝子をMutMap法(Abe et al 2012 *Nat. Biotech* 30: 174-178)などのNGS解析(研究協力者: 阿部陽博士)により同定し、性状解析する。

3. 研究成果

申請者は本実験系をEMS処理したシロイヌナズナ変異体のスクリーニングに活用し、ウイルス増殖・発病関連因子の順遺伝学的同定を試みた。エストラジオール処理と低温(18℃)への温度シフトによって簡便に同調的なウイルス感染の大規模発動が可能な本実験系を用いて、形質評価の容易な病徴を

指標にすることで、約35,000系統以上のEMS変異体を1年ほどの短期間でスクリーニングすることができた(図2)。現在までに約70,000系統の変異株の1次スクリーニングを完了している。得られた候補変異株は200系統以上であり、それらについて、SWBV-C1接種による2次スクリーニングを実施し、36系統のウイルス増殖抑制候補変異体を得られた(令和5年度日本植物病理学会東北部会発表)。そのうちの1系統(YA29)についてMutMap法(Abe et al 2012 *Nat. Biotech* 30: 174-178)による原因遺伝子の同定を試みたところ、第3染色体上の領域とウイルス抵抗性に有意な関連が認められ(図3)、同領域内の*eIF4G*遺伝子にナンセンス変異が見つかったことから原因遺伝子候補と考えられた。そこで、YA29以外の*eIF4G*機能破壊株を用いた感染実験を行ったところ、同様の形質を示したことから、*eIF4G*がSWBV-C1増殖に重要な役割を果たすことが示された。本実験系と近年のNGS技術を組み合わせることにより、変異体の単離から1年ほどで迅速にウイルス増殖制御因子を同定できることが示された。*eIF4G*は翻訳開始複合体の主要因子で

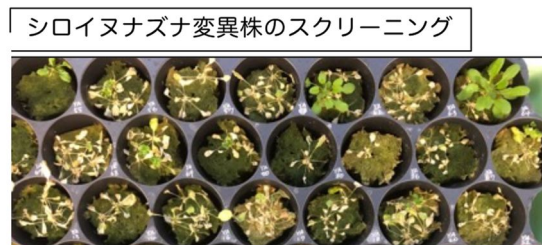


図2 SWBV感染発動系を用いたウイルス耐性変異体のスクリーニング。

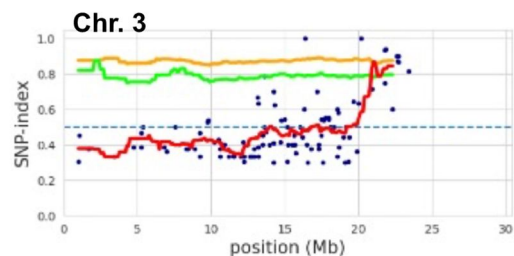
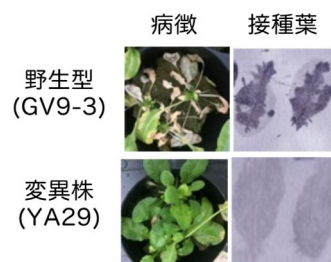


図3 同定されたSWBV感染抑制系統の順遺伝学的解析(上) SWBV感染抑制変異体(YA29)の病徴とウイルス増殖(ウイルス外被タンパク質の検出)。(下) Mutmap法による、YA29の原因遺伝子のマッピング(第3染色体末端の*eIF4G*遺伝子の機能欠損)。

ある。シロイヌナズナにおける eIF4G の isoform である eIFiso4G1、eIFiso4G2 をはじめ、eIF4E、eIFiso4E を含めた翻訳開始複合体各遺伝子への変異の影響を調べたところ SWBV-C1 はシロイヌナズナにおいて特に eIF4E と eIF4G を使っていることが明らかとなった。

eIF4E と eIF4G は様々なウイルス増殖に関わることが知られており、potyvirus などでは劣勢の抵抗性遺伝子としても活用されている。本実験系の SWBV-C1 とシロイヌナズナとの相互作用で得られた情報がより多様なウイルス感染に適用できる可能性を検討するため、1 次スクリーニング後の変異株集団に SWBV-C1 とは遠縁のキュウリモザイクウイルス (CMV) を接種したところ、CMV 抵抗性候補系統が高効率で単離できる (89 系統中 18 系統) 予備的結果も得られた。今後、1 次スクリーニングで選抜された変異株集団をライブラリー化し、他のウイルス感染へ適用することにより、複数のウイルス増殖に影響を与える中核的宿主因子の同定がより容易に可能になるのではないかと考えられた。

一方、スクリーニングにおけるレポーター遺伝子を活用したウイルス増殖の定量的評価については形質転換シロイヌナズナでの形質が安定せず、大規模に活用する段階には至っていない。一方で、これまでの経験から、SWBV-C1 感染は本実験系も含めて病徴の発達速度が緩やかで、1 週間ほどでは観察されず、2 週間ほどで顕著に見出され、4 週間ほどで植物体全体に激しい黄化、萎縮、壊死をもたらすことがわかっている。この緩やかかつ明瞭な病徴進展を指標にすることで、野生型よりも早く / 激しく発病する変異株のスクリーニングを開始し、現在、1 次スクリーニング後の候補変異株を 50 株以上得た。これらを解析することにより、ウイルス増殖を正に制御する因子のみならず、負に制御する抵抗性関連因子の同定も可能となることが期待される。

今後は植物免疫機構も視野に入れ、複数のウイルスに影響する中核的なウイルス増殖制御因子の同定に取り組み、その機能解析を通じて、新規のウイルス制御技術の開発につなげていく予定である。

5. 主な発表論文等〔雑誌論文〕(計1件)

1. 藤崎恒喜、館田知佳、ドミンゲズ ジョン、関根健太郎、西原昌宏 (2022)

Basic research of plant-pathogen interactions from gentian fields、植物感染生理談話会論文集 (日本植物病理学会)、査読無、56、97~105.

〔学会発表〕(計1件)

1. 藤崎恒喜、阿部善子、阿部陽、岩井摩莉、John Jewish A. Dominguez、三瀬和之

低温依存的ウイルス増殖を利用した大規模ウイルス感染発動系の確立、日本植物病理学会東北部会、2023

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織 なし(単独)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 藤崎恒喜、館田知佳、ドミンゲズ ジョン、関根健太郎、西原昌宏	4. 巻 56
2. 論文標題 Basic research of plant-pathogen interactions from gentian fields	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 植物感染生理談話会論文集	6. 最初と最後の頁 97-105
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 無
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2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤崎恒喜
2. 発表標題 リンドウ畑発の基礎研究を目指して
3. 学会等名 植物感染生理談話会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤崎恒喜、岩井摩利、阿部善子、John Jewish A. Dominguez、藤永真史、三瀬和之
2. 発表標題 リンドウの新規病原ウイルス、シクテウォーターボーンウイルスの宿主適応機構の解析
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------