

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658036

研究課題名(和文) サブウイルスRNA病原体の失われた環を繋ぐ新型リボザイムの基本構造と新機能解析

研究課題名(英文) Characterization of basic structure and function of a new ribozyme linking groups of subviral RNA pathogen

研究代表者

佐野 輝男 (Sano, Teruo)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：30142699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：サブウイルスRNAとは宿主に依存して自律複製するウイロイドとウイルスに依存して複製するサテライトRNAを包含したRNAの総称である。特にウイロイドと小環状サテライトRNAの一部には共通の保存配列を有するリボザイム活性が認められることからサブウイルスRNAの単系統説が提唱されている。中国の桑樹から分離された新規ウイロイド様小環状RNAが有するハンマーヘッド型リボザイムと新規リボザイムの分子構造、自己切断活性及び遺伝的多様性を分析し、リボザイム活性に影響を与える複数の塩基変異を検出した。自己複製能の欠如とリボザイム特性から桑小環状RNAは環状サテライトRNAに所属させるのが妥当と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Subviral RNA pathogen is a group of small RNA consisting of viroid which replicates autonomously depending on host transcription machinery and virus satellite RNA which replicates depending on host virus. Among them, viroid and viroid-like small circular satellite RNA are thought to be a same origin because they share similar molecular size, structure, and functions such as ribozyme activity. Here in this research, we have analyzed a new viroid-like small circular RNA isolated from mulberry (*Morus alba*) cultivated in China on the molecular structures, genetic diversity and new ribozyme activity found in the minus strand, and detected a couple of mutations which could change the potential of ribozyme activity. Taking the lacking of ability to replicate autonomously and the structural similarity of new ribozyme to hairpin-ribozyme in considerations, Mulberry small circular RNA can be placed in small circular viral satellite RNA group.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学・病原性因子

キーワード：サブウイルスRNA病原体 ウイロイド サテライトRNA リボザイム ヘアピン型リボザイム ハンマーヘッド型リボザイム

1. 研究開始当初の背景

1970年代、ウイルスゲノムの10分の1にも満たない小さな病原RNA因子(ウイロイド)が発見されて以来(Diener 1971)、様々な植物から様々なウイロイド、さらにウイルスに付随して複製し、病原力を発揮する多様なサテライトRNAが発見された(Kaper et al 1977)。ウイロイドは宿主の転写系を利用して自律複製する250~400ヌクレオチド程度の環状1本鎖RNAで、ポスピウイロイドとアブサンウイロイドの2科に分類される。サテライトRNAはウイルスに付随して複製し、大型群、小型線状群、環状群がある。環状群は‘ウイロソイド’とも呼ばれ、220~400ヌクレオチド程度のウイロイドと良く似た環状1本鎖RNA構造を有する。ウイロイド、環状サテライトRNA、小型線状サテライトRNAはタンパク質情報をコードしない‘非コードRNA’で、分子構造と複製様式に類似性があることからサブウイルスRNA病原体として分類されている(Virus Taxonomy VIII, 2005)。

アブサンウイロイド科ウイロイドと環状サテライトRNAは、RNA自己触媒機能‘リボザイム’活性を有し、原始RNAワールドの生きた化石と考えられる存在自体の興味からリボザイム機能の有効利用に至るまで、病原体の枠を超えた幅広い分野の研究対象となっている。Elena et al (1992, 2001)はウイロイドとサテライトRNAにB型肝炎ウイルス随伴RNAを加えた分子系統解析から、これらが同一起源とする仮説を提唱した。しかし、発見された種数が少なく、確かな結論を導く情報が不足している。

2. 研究の目的

最近、著者らの研究グループは、中国で17世紀初頭から発生が報告されている矮化症状の桑樹(*Morus alba*)から分離した新規小環状1本鎖RNA(以下、桑小環状RNA、Mulberry small circular RNA 或は mscRNA)が、アブサンウイロイド科ウイロイドと環状サテライトRNAに一般的に見出されるハンマーヘッド型リボザイムと一部のサテライトRNAに特徴的なヘアピン型リボザイムに類似した新規リボザイム構造を有することを見出した(佐川ら 2012)。

本研究では、まず、mscRNAの地理的発生分布、mscRNAの遺伝的多様性、mscRNAの有する新規リボザイムの分子構造と特性、mscRNAの自己複製能の有無などを総合的に分析し、mscRNAがウイロイドの性質を有するのか、或はサテライトRNAの1種として分類するのが妥当かを評価する。

また、mscRNAは機能的・構造的にウイロイドとサテライトRNAを繋ぐ重要な種と位置づけられるため、この種が有する新規リボザイムの基本構造と特性を解析することでサテライトRNAからウイロイドに至るリボザイムの分子進化、つまり、サブウイルスRNA病原

体の分子進化の全体像を理解し、新規リボザイムの有効利用への新たな道を拓くことを目的とする。

3. 研究の方法

mscRNA リボザイムの特性：研究開始時点で、矮化症状の桑樹から分離した mscRNA のプラス鎖にはハンマーヘッド (HH) 型リボザイムの保存配列が、またマイナス鎖にはヘアピン (HP) 型リボザイムと類似した新規な配列が確認されていた。まず、プラス鎖の HH 型リボザイムの保存配列から予測される切断部位を実験的に確認し、次にマイナス鎖から見出された新規リボザイムの切断部位をプライマーエクステンション法で分析し、結果をもとにリボザイム活性に必要な高次分子構造を予測し、その構造と活性特性を既知の HH 型及び HP 型リボザイムと比較しながら明らかにする。

mscRNA の発生分布と遺伝的多様性：新規リボザイム配列の保存性や多様性を把握するために、日本国内、及び中国農業科学院・李世訪教授(海外研究協力者)の協力を得て、現在世界で唯一の mscRNA 流行地帯である中国の桑樹栽培地域で mscRNA を収集し、遺伝子配列を解析する。

mscRNA の自己複製：新規リボザイムを有する mscRNA がウイロイドとサテライト RNA を繋ぐ重要な位置に存在するのではないかとこの観点に立ち、まず、mscRNA の自律複製能の有無を解析し、その分類学的位置(ウイロイドか環状サテライト RNA か)を明確にして、ウイロイドからサテライト RNA に至るサブウイルス RNA 病原体の分子進化過程を考察する。なお、研究開始時点で mscRNA の自律複製能を示唆する論文が発表されていた(Fei et al 2009, Wang 2009, Wang et al 2010)が、実験上の不備が多く、科学的な証明には至っていなかった。

新規リボザイムがサブウイルス RNA 病原体の分子進化に果たす役割の解析：本研究で得られた新規リボザイムの保存配列と基本構造に関する知見に基づいて、mscRNA の新規リボザイムと既存のサテライト RNA の HP 型リボザイムを相互に交換した改変型 mscRNA 及び改変型サテライト RNA を作出し、単独或はヘルパーウイルスと一緒にそれぞれの宿主植物に接種し、感染能と感染効率を分析し、野生型及び改変型のヘルパーウイルス依存度の変化を分析し、ウイロイドからサテライト RNA (或いはその逆)に至るサブウイルス RNA 病原体の分子進化過程を考察する。

4. 研究成果

mscRNA が有する *in vitro* リボザイム活性の確認と切断点の特定

mscRNA の全長 cDNA を 2 個タンデムに連結した cDNA クローン(以下 mscRNA ダイマー)から調製したプラス鎖とマイナス鎖 *in vitro* 転写物を MgCl₂ 存在下でインキュベート後、

8M 尿素 - 7.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、リボザイム活性の有無を確認した。その結果、プラス鎖、マイナス鎖ともに実験的に *in vitro* 自己切断活性が確認され、プラス鎖では HH 型リボザイム保存配列から予測される切断部位で切断されたと考えられるサイズの断片が検出された。一方、マイナス鎖は HP 型リボザイムに類似した新規のリボザイム機能で自己切断するものと考えられた。

両鎖の切断部位を特定するために、*in vitro* 自己切断で生じた断片を回収して、プライマーエクステンション法でさらに分析した結果、プラス鎖の自己切断位置は既知の HH 型リボザイム保存配列から予想される自己切断位置と一致し、一方、マイナス鎖の自己切断点は HP 型リボザイムと類似した保存配列から予想される切断点と 1 塩基ずれた塩基に位置することが明らかになった (Bruening 1990, Buzayan 1990, Buzayan et al 1986)。

mscRNA プラス鎖のリボザイム活性については、HH 型リボザイム保存配列 "GAAACGAAACGAAAC" 中の C が U に変異していた。アブサンウィロイド科の Eggplant latent viroid (ELVd) は、その両極鎖に HH 型リボザイムの保存配列 "GAAACGAAACGAAAC" を有し、C が U に変異していたと報告されていることから (Fadda et al 2003) mscRNA プラス鎖の HH 型リボザイムは ELVd と同一と考えられた。mscRNA マイナス鎖のリボザイムは HP 型と類似性があるものと考えられたが、HP 型リボザイムはまだ 3 例しか報告されておらず、自己切断部位と自己切断に必要な分子機構の多様性については、さらに検討が必要である。

mscRNA の発生分布と遺伝的多様性

これまで、mscRNA は中国の浙江省で栽培されている桑樹からのみ検出が報告されている (Fei et al 2009, Wang 2009, Wang et al 2010)。そこで本試験は、中国浙江省以外で栽培されている桑樹にも mscRNA が感染しているか調査することを目的に、中国の江蘇省、江西省、山西省、日本の群馬県で栽培されている桑樹の mscRNA 検定を行った。また、本研究開始後にレバノンとイタリアの桑樹からホップ矮化ウィロイド (HpSVd) が検出されたことが報告された (Elbeaino et al 2012) ことから、HpSVd 感染の有無も同時に調査した。

その結果、江蘇省栽培桑樹 47 株中 41 株から mscRNA が検出され、江西省栽培桑樹 128 株からは検出されなかった。また、どちらの試料からも HpSVd は検出されなかった。陝西省で採集した試料では、81 株中 3 株から検出され、江蘇省と江西省の栽培桑樹同様 HpSVd は検出されなかった。以上の結果から、新たに江蘇省及び陝西の栽培桑樹に mscRNA が感染していることが明らかになった。また、陽性

シグナルが検出された全ての桑樹はモザイク、葉巻、黄化、漣葉のいずれかの病徴が見られた。

群馬県蚕糸技術センター及び群馬県立勢多農業高等学校の圃場の栽培桑樹からは mscRNA 及び HpSVd は検出されなかった。

新たに mscRNA の発生が確認された江蘇省産 10 試料を選択し、それぞれから 10 個、合計 100 個の cDNA クローンを選抜して塩基配列を解析し、93 個の mscRNA 全長塩基配列を得て、分離株集団内の遺伝的多様性を分析した。その結果、江蘇省 10 分離株は既報の浙江省分離株とほぼ同じ 355 ヌクレオチドで構成されていた。江蘇省集団には 3 種の主要変異が存在し、既報の浙江省分離株と 4 箇所、4 箇所、2 箇所それぞれ塩基置換変異が認められた。その内の 1 箇所の変異は江蘇省 10 分離株で共通に見られ、興味深いことにマイナス鎖の自己切断部位の 3 末端塩基に生じていた。また、江蘇省 2 分離株に見られたもう一つの変異は、やはりマイナス鎖のリボザイム活性に重要な役割を果たすと予想された領域のすぐ 5' 上流に生じていた。すなわち、これらの変異はマイナス鎖の自己切断活性に影響を及ぼす可能性が高く、結果として病原性に関与する可能性が示唆された。

mscRNA の自己複製能

mscRNA の 2 量体 cDNA クローン (mscRNA ダイマー) を作成し、*in vitro* 転写物を 1 年生実生桑樹 (*Morus* spp.) 6 株、トマト (*Solanum lycopersicum* cv. Rutgers) 12 株、キュウリ (*Cucumis sativus* cv. Suvo) 10 株、実生カラハナソウ (*Humulus lupulus* var. cordifolius) 20 株に接種した。

接種 3 週間 ~ 3 カ月後に、RT-PCR 法と RNA ゲルプロットハイブリダイゼーション法で検定した結果、元々の宿主である桑樹を含む全ての植物が陰性であった。すなわち、mscRNA が単独で自己複製する可能性は極めて低く、ウィロイドよりウイルスに付随して複製する環状サテライト RNA と結論付けるのが妥当と考えられた。ただし、現時点で、mscRNA の複製をサポートするヘルパーウイルスが見つからないことから、これを環状サテライト RNA と結論付ける直接的な根拠はない。ヘルパーウイルスに関しては今後さらに検討が必要である。

mscRNA 感染実験系の構築

研究開始時点では、mscRNA の自己複製能を示唆する論文が発表されていたので (Fei et al 2009, Wang 2009, Wang et al 2010) mscRNA と既報の環状サテライト RNA 間でリボザイム保存配列を交換し、自己複製能の有無との関連性を分析することを計画した。そこで、まず mscRNA のマイナス鎖の新規リボザイムをタバコ輪点ウイルス (ToRSV) 環状サテライト RNA のマイナス鎖に存在する HP 型リボザイムに変換したものの、また逆に ToRSV 環状サ

テライト RNA のマイナス鎖の HP 型リボザイムを mscRNA マイナス鎖の新規リボザイムに変換したものの設計し、感染実験の準備を進めた。しかし、研究終了時点において、上記に示したように、mscRNA はウイロイドのように単独で自律複製能を持たない可能性が強く示唆されたので、mscRNA の複製をサポートする性質を有する宿主ウイルスをスクリーニングする実験系を構築した。すなわち、現時点までに、タバコモザイクウイルス (TMV)、キュウリモザイクウイルス (CMV)、数種ネポウイルス (環状サテライト RNA を有する種が多い) を mscRNA ダイマーと混合接種し、接種上葉から mscRNA の検出を試みている。

サブウイルス RNA の系統解析

Diener (1989) がサブウイルス RNA の分子進化に関する仮説を提唱した後、Elena et al (1991, 2001) はサブウイルス RNA の分子系統解析を行い、ウイロイドとウイロイド様環状サテライト RNA が共通の起源を持つ可能性を論議している。本研究では、Elena et al (2001) の報告以降、新たに報告された 4 種のウイロイドと mscRNA 及び mscRNA と 38 ヌクレオチドの配列相同性を示す Cherry small circular viroid-like RNA を分析に加えてサブウイルス RNA 全体の分子系統解析を行ない、mscRNA とウイロイド及び環状サテライト RNA の分子系統関係を評価した。

Elena et al (2001) のサブウイルス RNA の分子系統解析では、ポスピウロイド科の各属、アブサンウイロイド科の各属、Sobemovirus 属環状サテライト RNA、Nepovirus 属環状サテライト RNA、Polerovirus 属環状サテライト RNA がそれぞれ近縁となり、ポスピウロイド科ウイロイドと環状サテライト RNA の中間にアブサンウイロイド科ウイロイドが位置している (図 1)。

本研究で作成した無根系統樹 (図 2) では、ポスピウロイド科のアブスカウロイド属、ホタウイロイド属、コレウイロイド属は単系統となった。ポスピウロイド属とコカドウイロイド属では、ポスピウロイド属の Pepper chat fruit viroid (PCFVd) と Iresine viroid 1 (IrVd) がコカドウイロイド属 4 種の基部から分枝していたが、それ以外は各属でまとっていた。アブサンウイロイド科に関しては、ペラモウイロイド属の CChMVd と PLMVd は近縁となったが、他の 2 属 (アブサンウイロイドとエラウイロイド) に近縁性は見られなかった。環状サテライト RNA は、リボザイムの特性からプラス鎖とマイナス鎖に HH 型リボザイムを持つ Sobemovirus 属グループとプラス鎖に HH 型リボザイムを持ちマイナス鎖に HP 型リボザイムを持つ Nepovirus 属グループに分けることができる。しかし、塩基配列の類似性に基づく系統樹上では宿主ウイルスの分類群は反映されなかった。

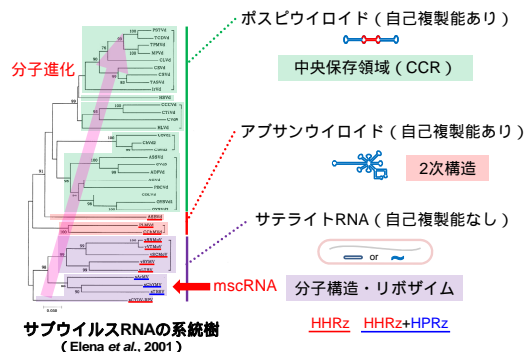


図 1 サブウイルス RNA 分子系統樹

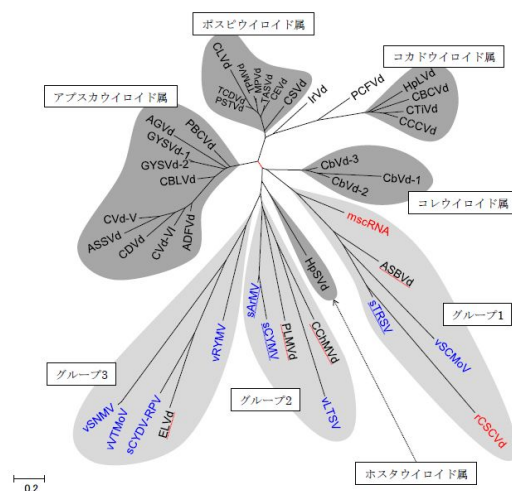


図 2 ウイロイド、サテライト RNA、桑小環状 RNA を含む無根系統樹

ウイロイドの科及び環状サテライト RNA のグループごとの系統関係を見ると、樹上赤線枝を基準に大きく二つに分かれた。赤の上側は、ポスピウロイド科ウイロイド属、赤線枝の下側には環状サテライト RNA とアブサンウイロイド科の 3 グループが混在した。ポスピウロイド科のホスタウイロイド属及びコレウイロイド属はその間に位置した。

現在まで、サブウイルス RNA 内の分類学的位置が定まっていない mscRNA と欧州のチェリーから分離された小環状 RNA (rCSC) は、それぞれコレウイロイド属グループと ASBVd の間、vSCMoV と sTRSV の間に位置した。つまり、塩基配列の類似性に基づく分子系統解析では、mscRNA はウイロイドに、rCSC は環状サテライト RNA により近縁と評価されたことになる。ただし、ブートストラップ値は全体的に低く、41 箇所の分岐中で 50% を超えたのは 10 箇所、さらにその中で 80% を超えたのは 3 箇所のみであった。

さらに優先する保存配列を変えていくつかのパターンのアライメントに基づく分子系統樹作成を試みたが、Elena et al (1991, 2001) が報告した系統樹と同様の樹形は再現

されなかった。これは Jenkins et al (2000) が指摘したように、サブウイルス RNA の分子進化を配列のみで評価することに疑問を抱かせる。ウイロイドのヌクレオチド変異率は RNA ウイルスを含めた全ての生物中で最も高いことから (Gago et al 2009) 配列類似性だけで分子進化を論じるには限界がある。サブウイルス RNA の分子進化を紐解くためには、配列だけでなく、宿主域、病原性、リボザイム特性などの生物学的諸性質を加味して総合的に評価していく必要がある。リボザイム特性を加味して mscRNA のサブウイルス RNA 分子系統上の位置を評価すると HH 型リボザイムと HP 型リボザイムを有する Nepovirus 属グループに所属させるのが妥当ではないかと考えられた (図 1)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Tsuda S, Sano T: Threats to Japanese agriculture from newly emerged plant viruses and viroids. *J Gen Pl Pathol*, 80: 2-14, 2014

〔学会発表〕(計 2 件)

Teruo Sano: Current status of viroid disease epidemics in the world. 2013 Korean Society of Plant Pathology. International Conference. October 18, Suncheon National University, Suncheon Korea, (Invited speaker). 2013

Teruo Sano: Molecular ecology of viroids and viroid diseases of crop plants. Special lecture in Botanical Society, University of Mysore (Department of Studies Botany). December 2, Mysore, India, (Lecturer). 2013.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

SANO,

Teruo <http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/lab/3/plapath/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 輝男 (SANO, Teruo)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：3 0 1 4 2 6 9 9