

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292021

研究課題名(和文) トウガラシに見出された強力な二本鎖RNA分解酵素の同定と生体内での役割解明

研究課題名(英文) Determination of double-stranded RNA digestion activity in Capsicum and its role

研究代表者

細川 宗孝 (Hosokawa, Munetaka)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40301246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：トウガラシ(*Capsicum annuum*)品種群の中から、RNase活性が極めて弱い品種を選抜した。RNase活性の高い*C. chinense* 'CP'との間で種間雑種を作成し、さらにBC1系統を得た。これらの組み合わせの活性調査の結果、RNase活性を制御する遺伝子は1遺伝子である可能性が高かった。また、タンパク質の抽出・精製によって活性成分を特定しようと試みたが、特定には至らなかった。分離集団を用いたポジショナルクローニングが有力な方法であろうと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Two cultivars (*Capsicum annuum*), from which RNase activities were not detected. So, we produced F1 hybrid and BC1 lines using the non-RNase cultivars and a cultivar which has very strong RNase activities (*C. chinense* 'CP'). The RNase activity analysis using electrophoresis revealed that the gene controlling RNase activities would be single locus. Next, we tried to determine the causal protein of RNase activities using purified proteins, however we could not determine. The best way to determine the causal gene was considered to be positional cloning technique using the BC1 lines.

研究分野：蔬菜花卉園芸学

キーワード：トウガラシ RNase BC1 ウイロイド ウイルス 二本鎖RNA分解

1. 研究開始当初の背景

抗ウイルス作用があると言われているトウガラシ抽出液とウイルス・ウイロイドの混合液をベンサミアナタバコに接種するとほとんど感染しなかった。トウガラシとウイロイドの混合液を RNA ゲルプロット分析したところ、多量のウイロイド分解産物が検出された。分解反応は非常に速く、20、3 秒間でウイロイドはほぼ完全に分解された。トウガラシ以外の植物も実験に用いたがトウガラシと同様の効果のあるものは一つもなかった。トウガラシの葉には極めて強い活性があるが、茎や果実にはほとんど活性が見られなかった。なお、ウイロイドは一本鎖環状 RNA を持つ植物病原体で、分子内で強固な二本鎖構造を作るため一般的な RNase では分解に長時間を要する(Haseloff and Symons, 1981, Nucleic Acid Research)。トウガラシ抽出液の RNA 分解活性は温度依存的であり 60℃ ~ 70℃ で活性が最大となった。また、pH は 5.0 以下になると著しく活性を失った。高温処理やフェノール処理で非可逆的に活性を失うこと、添加する還元剤によって活性が変化することなどからタンパク質の可能性が示唆された。硫酸アンモニウムによるタンパク質の濃縮による分解活性はタンパク質の濃度依存的であった(Iraklis, Hosokawa et al., 2011, 園芸学研究(別))。SDS を抽出液に添加すると一本鎖 RNA の分解活性は変わらず、二本鎖 RNA の分解活性は完全に失われた。一方、抽出液にプロテアーゼ処理を行うと、一本鎖 RNA の分解は完全に失われたが、二本鎖 RNA の分解は維持された。また、SDS を含まない電気泳動でプロテアーゼ処理した抽出液を電気泳動し、各分子量の画分を分取し分解活性を調べると 80kDa 以上の高分子側で強い活性が見られ、非常に薄いタンパク質のバンドが確認された。以上のことから、トウガラシの持つ二本鎖 RNA 分解活性は、非常に強力なものであると考えられる。推定分子量から、これまで報告のない新奇な分解酵素が葉中にある可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究ではトウガラシの葉中に存在する RNase 活性本体を同定し、生体内での役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *C. annuum* 4 品種: ‘紫’, ‘日光’, ‘浜ニューヨーククリーム’および‘浜クロピー’を供試した。それぞれの葉 0.1 g (新鮮重) を乳鉢ですりつぶし、1 mL のリン酸バッファー(50 mM, pH6.5) を用いて抽出を行った。12000 rpm で 5 分間遠心を行った後、上澄みを回収して粗抽出液とした。以下の手順により、粗抽出液を用いて非還元 SDS-PAGE で電気泳動し、RNase 活性染色を行った。また、それぞれの抽出液あるいはリン酸バッファー(コントロール, pH 6.5) 20 μ L を‘ピアト’の CSVd 高濃

度保毒個体の全 RNA 溶液(150 ~ 200 ng \cdot μ L⁻¹) 20 μ L と混合した。室温(溶液温度は約 20℃) で 30 秒間インキュベートした後、すぐにフェノール・クロロホルム 40 μ L を入れ、素早く混合した。その溶液からエタノール沈殿によって回収し、精製した RNA に対して、以下の手順で RNA ゲルプロット解析を行った。また、Yen・Green (1991) を一部改変し、活性染色を行った。

(2) 活性をほぼもたない‘紫’および葉に強い RNA 分解活性をもつ CP(*C. chinense*) を供試し、種間雑種‘紫’ \times CP を作出した。第 1 節に従って、粗抽出液を用いて RNA ゲルプロット、および非還元 SDS-PAGE で電気泳動後、RNA 分解活性染色を行った。

(3) 本実験で供試した‘紫’は雄性不稔系統であった。そこで、両親である‘紫’の稔性系統および CP と‘紫’ \times CP の戻し交雑を行い、BC1 の RNA 分解活性を評価した。‘紫’ \times CP を種子親として、活性をほぼもたない‘紫’(*C. annuum*, 稔性系統)および活性が強い親 CP を用いて BC1 をそれぞれ 200 個体および 48 個体作出した。展開第 2-4 葉を採取し第 1 節に従って粗抽出液を作成し、非還元 SDS-PAGE で電気泳動後、RNA 分解活性染色を行った。また、(‘紫’ \times CP) \times ‘紫’ 4 個体について、RNA ゲルプロットによって CSVd 分解能を調査した。

(4) トウガラシ‘Sy-2’の葉約 30 g を供試し、リン酸バッファー(50 mM, pH6.5) を 300 mL 加えて抽出した。ミラクロスを用いて葉抽出液を 1 回濾過し、一晚静置した後、4,9000 rpm で 10 分間遠心した。遠心後、上清を回収して粗抽出液とした。粗抽出液を用いて以下の手順で硫酸分画を行い、60%飽和画分を回収した。さらに、3 kDa を cut off する限外濾過膜で 60%飽和画分溶液を遠心し、脱塩処理をした。洗浄液にリン酸バッファー(50 mM, pH6.5) を用いて上清を洗浄後、バッファーを Tris-HCl(20 mM, pH8.0) に変えた後、3 kDa を cut off する限外濾過膜で活性画分 8 ~ 10 を遠心し、活性画分の濃縮を行った。得られた溶液 200 μ L を濃縮後の葉抽出液とした。葉抽出液に対して 1/10 量の Proteinase K (4 mg/mL) を添加し、37℃ で 5 時間から一晚インキュベートした。低圧クロマトグラムシステムを用いて、以下の手順により、‘Sy-2’葉抽出液の濃縮液の陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。サンプル添加時から 2 mL ずつ画分を回収し、その後溶出バッファー添加時から 1 mL ずつ画分を回収した。回収した画分に対して順に画分 1, 2, 3... と番号を付け、画分 33 まで回収した。回収した 33 画分のうち、タンパク質のピークが確認されたところを中心に画分 1 ~ 14 を供試し、CSVd 分解活性を調査した。第 1 章第 1 節の方法に従い、RNA ゲルプロットを行い、CSVd 分解

産物の有無を調査した。画分液のかわりに開始バッファを混合したものをコントロールとした。また、第1章第1節に従って非還元 SDS-PAGE で泳動後、銀染色を行った。

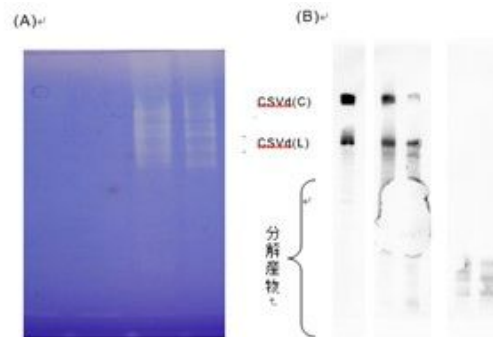
(5) 第1節で得られた‘Sy-2’葉抽出液の陰イオン交換クロマトグラフィーの画分 14 および 15 を、弱い RNA 分解活性をもつ画分として供試した。葉約 750 g 分の画分 14・15 を、3 kDa を cut off する限外濾過膜で遠心し、濃縮液を作成した。第1章第1節に従い、濃縮液を非還元 SDS-PAGE で泳動した後、以下の手順に従いゲル中の 1 か所(第7図)からタンパク質の抽出を行った。ゲル抽出は 4 反復を行った。得られたゲル抽出産物を用いて、第1章第1節に従い、Native-PAGE および非還元 SDS-PAGE 電気泳動後、以下の手順に示した銀染色あるいは活性染色を行った。さらに Native-PAGE 電気泳動後、以下の手順により、メンブレンへのタンパク質転写およびクマシーブリリアントブルー(CBB)染色を行った。CBB 染色で認められた 4 つのバンドに対してペプチドシーケンス(ニッピ、茨城)を、銀染色で認められた 2 つのバンドに対して LC MS/MS(GENOMINE 韓国)で解析し、候補タンパク質を推定した。候補タンパク質の塩基配列と一致する遺伝子を‘Sy-2’の全ゲノム情報から探し、第2表に示した Primer を設計した。RNA 分解活性が強いものとして‘Sy-2’、CP、‘紫’×CP、RNA 分解活性が弱いものとして‘紫’、および第1章で作出した(‘紫’×CP)×‘紫’5 個体(活性が弱い 2 個体、活性が強い 3 個体)から第1章第1節に従って RNA を抽出し、半定量 RT-PCR を行った。なお、内部標準には actin を用いた。

4. 研究成果

(1) RNA 分解活性染色において、‘浜ニュークリーム’および‘浜クロピー’ではスメア状に染色が白くぬけ、活性が認められた(第1図A)。一方、‘紫’および‘日光’では染色が抜けず活性が認められなかった(第1図A)。RNA ゲルプロットにおいて、‘浜ニュークリーム’および‘浜クロピー’では CSVd 分解産物が認められたが、‘紫’および‘日光’では CSVd 分解産物は認められなかった(第1図B)。よって、特に弱い *C. annuum* の品種の中でも、‘日光’および‘紫’は活性をほぼもたない品種であると考えられ、弱い品種の 2 次スクリーニングに成功した。活性染色において、雑種‘紫’×CP は、RNA 分解活性が強い親 CP と同様に白くぬけた(第2図A)。また、RNA ゲルプロットにおいて、雑種は CP と同様に CSVd を分解した(第2図B)。よって、雑種‘紫’×CP は CP と同じく強い RNA 分解活性を有すると考えられた。

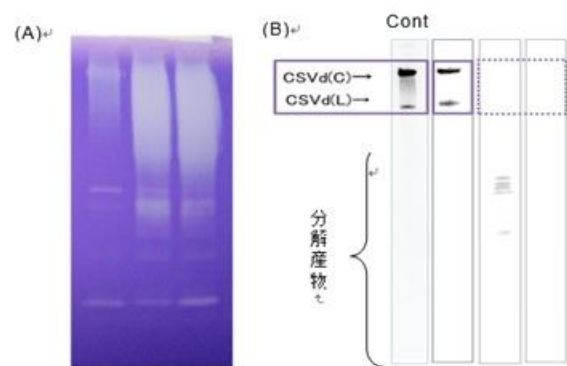
(2) (‘紫’×CP)×CP: 供試した 48 個体は全て強い活性をもつ親と同様の抜け方をし、全て強い RNA 分解活性を有していた(第

3 図)。



第1図 *C. annuum* 4 品種の RNA 分解活性。

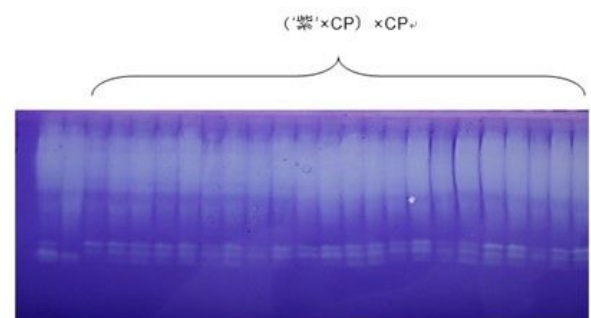
(A) RNA 分解活性染色(非還元 SDS-PAGE) (B) RNA ゲルプロット。左から順に、‘紫’、‘日光’、‘浜ニュークリーム’および‘浜クロピー’を泳動した。RNA ゲルプロットにおいて、CSVd(C)は環状 CSVd、CSVd(L)は直鎖状 CSVd を表す。Cont. では葉抽出液の代わりにリン酸バッファと混合した。



第2図 ‘紫’、‘紫’×CP および CP の RNA 分解活性。

(A) RNA 分解活性染色(非還元 SDS-PAGE)、(B) RNA ゲルプロット。

左から順に、‘紫’、‘紫’×CP および CP を泳動した。RNA ゲルプロットにおいて、CSVd(C)は環状 CSVd、CSVd(L)は直鎖状 CSVd を表す。Cont. では葉抽出液の代わりにリン酸バッファと混合した。

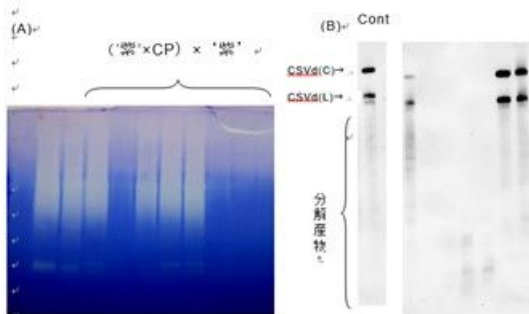


第3図 (‘紫’×CP)×CP の RNA 分解活性(非還元 SDS-PAGE 後の RNA 分解活性染色図)。

左から順に、‘紫’、‘紫’×CP、CP および (‘紫’×CP)×CP 31 個体を泳動した。

(‘紫’×CP)×‘紫’: RNA 分解活性染色において BC1 は活性が強い個体および弱い個体が明瞭にわかれ、それぞれ 106:94 個体存在していた(第4図A)。また、RNA ゲルプロットにおいて、活性染色で活性が強い BC1 は

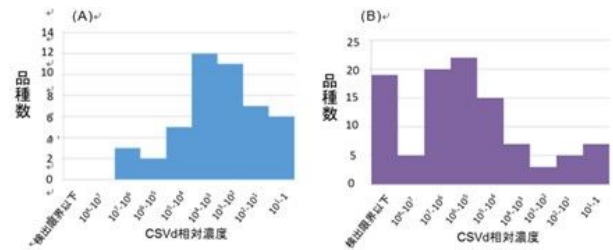
CP および‘紫’×CP と同様に CSVd を分解し、活性染色で活性をほとんどもたない BC1 は、‘紫’と同様に CSVd を分解しなかった (第 4 図 B)。



第 4 図 ‘紫’×CP × ‘紫’の RNA 分解活性。

(A)RNA 分解活性染色 (非還元 SDS-PAGE) (B)RNA ゲルブロット
(A)左から順に、‘紫’、‘紫’×CP、CP および ‘紫’×CP × ‘紫’ 8 個体を泳動した。本泳動では、‘紫’と同じく活性のないものが 4 個体、CP と同じく活性の強いものが 4 個体見られる。
(B) CSVd(C)は環状 CSVd、CSVd(L)は直鎖状 CSVd を表す。Cont. では葉抽出液の代わりにリン酸バッファと混合した。左から順に、‘紫’、‘紫’×CP、CP および ‘紫’×CP × ‘紫’ 4 個体 (A で活性が強かった 2 個体、ほとんど活性をもたなかった 2 個体の順) を泳動した。

RNA 分解活性が強さと品種の間でヒストグラムが描けることから (第 5 図; 園芸研 13 別 1, 2014), RNA 分解活性の強さは量的要素が強い形質であると考えられた。しかし、本実験では RNA 分解活性がとても強い品種から弱い品種まで広く存在することに着目し、強い RNA 分解活性を質的に評価できないかを検討した。‘Sy-2’をはじめ *C. chinense* の中で特に強い RNA 分解活性をもつ品種は既に見つかった。そこでまず、RNA 分解活性が弱い品種が多い *C. annuum* から特に弱い 4 品種を供試した 2 次スクリーニングから、RNA 分解活性をほぼもたない‘紫’および‘日光’を選抜した (第 1 図)。「紫」と強い RNA 分解活性をもつ CP (*C. chinense*) と種間雑種および BC1 を作出し、それらの RNA 分解活性が強い個体および弱い個体の分離比を調査すると、(‘紫’×CP)×CP は供試した 48 個体は活性が強く (第 3 図)、(‘紫’×CP)×‘紫’は活性が強い個体および弱い個体がそれぞれ 106 : 94 個体存在した (第 4 図)。強い RNA 分解活性が一遺伝子(A)に支配される優性形質であると想定すると、第 2 表に示した分離が推察された。雑種 (Aa) と強い活性をもつ親 (AA) との BC1 は AA:Aa=1:0 となり、全ての BC1 は強い活性を示し (A:a=1:0)、弱い活性をもつ親 (aa) との BC1 は Aa:aa=1:1 と考えられ (A:a=1:1)、これは本実験の結果と一致した ($p=0.40$) (第 1 表)。よって、本実験で用いた‘紫’および CP との組み合わせでは、強い RNA 分解活性は一遺伝子に支配される優性形質であり、量的因子に制御される中での主動因子の存在が考えられた。今後はポジショナルクローニングによる関連遺伝子の同定を期待する。



第 5 図 Capsicum 属 2 種の RNA 分解活性。

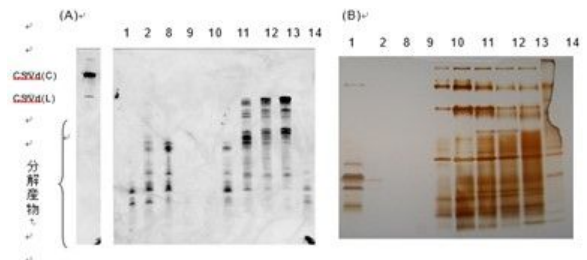
(A) *C. annuum* (B) *C. chinense*。

CSVd 高濃度保毒系統の‘ピート’の全 RNA (200 ng/μL) 20 μL を各品種の葉の抽出液 20 μL と混合した後、RNA を精製し、real-time RT-PCR を用いて CSVd 濃度を測定した。葉抽出液の代わりにリン酸バッファを用いた処理区をコントロール区とし、コントロール区の CSVd 濃度を 1 とした。

第 1 表 RNA 分解活性の遺伝解析

	RNA分解活性強	RNA分解活性弱	期待値	χ^2 (p値)
‘紫’	0	2	—	—
CP	2	0	—	—
‘紫’×CP	2	0	1:0	—
(‘紫’×CP)×CP	46	0	1:0	—
(‘紫’×CP)×‘紫’	106	94	1:1	0.605 (0.40)

(3) ゲルブロットの結果から、画分 1.9.10 はもとの CSVd をほぼ分解するほどの強い RNA 分解活性をもっていた (第 6 図 A)。これは、神田 (2014) の結果と一致していた。画分 12-14 は弱い活性をもっていた (第 6 図 A) 強い画分 9 はタンパク質にはほぼタンパク質が含まれていないことから (第 6 図 A,B)、画分に含まれる総タンパク質量と画分がもつ活性の強さには関係がなさそうであった。



第 6 図 陰イオン交換クロマトグラフィーによる‘Sy-2’葉抽出液のタンパク質精製画分の RNA 分解活性。(A) RNA ゲルブロット (B) 活性染色 (非還元 SDS-PAGE)。

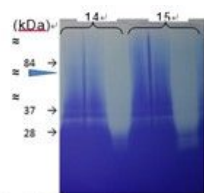
図中の原液は‘Sy-2’粗抽出液をさし、Cont. では画分のかわりに Tris-HCl (20 mM, pH8.0) と混合した。左から順に画分 1, 2, 8-14 を泳動した。

画分 14・15 の Native-PAGE 後の RNA 分解活性染色では、約 28-37 kDa の間に 2 本の活性バンドが共通して認められた (第 7 図)。このうちより小さい分子量のバンドをゲル抽出し (第 7 図)、再び Native-PAGE で泳動をすると、切り出し位置の大きさのタンパク質に加えて、切り出し位置と比較して分子量の大きいタンパク質が現れた (第 8 図右)。また、4 反復のうち約 100 kDa のタンパク質が現れたサンプルでは RNA 分解活性染色において高分子側が広範囲に白く抜け、活性が認められた (第 8 図左)。このサンプルを非

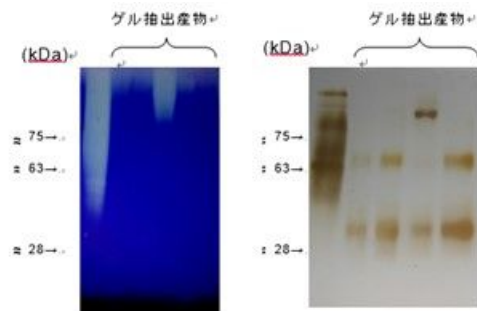
還元 SDS-PAGE で泳動すると、Native-PAGE で認められた約 100 kDa のバンドに加え、切り出した位置と比べて分子量の小さい約 18 kDa のバンドが新たに認められた(第 9 図右)。しかし非還元 SDS-PAGE では高分子側でも活性が認められなかった(第 9 図左)。

Native-PAGE 後の銀染色で認められた約 28-63 kDa の 2 本のバンド、および非還元 SDS-PAGE 後の銀染色で認められた約 18、100 kDa の 2 つのタンパク質を LC MS/MS で解析した。約 28-63 kDa の 2 本のバンドはアルブミンであった(データ略)。これはゲル抽出の際に用いたエリューションバッファーに含まれていた BSA が残って凝集したものだと考えられ、トウガラシ由来のものとは関係がなかった。また、約 100 kDa のタンパク質は同定できず、約 18 kDa のタンパク質は *Capsicum annuum* thionin-like protein (He ら, 2007) と高い相同性を示すと考えられた。半定量 RT-PCR によって *Capsicum annuum* thionin-like protein の発現量を調べたところ、活性の強さに大きく違いがある品種間において、この遺伝子の発現量に差は無かった(第 10 図)よって、この遺伝子の発現量とトウガラシがもつ RNA 分解活性の強さには関係が無いと考えられた。

CBB 染色に供試したサンプルでは約 100 kDa の高分子は認められず、CBB 染色では約 25-55 kDa の間に 4 つのバンドが認められた(第 11 図)。泳動は全て Native-PAGE で行ったため、切り出し位置とこれらのタンパク質バンドが一致するかは分からなかった。ペプチドシーケンス解析より各タンパク質の N 末端 5 残基の候補アミノ酸が得られた(第 4 表)。約 35-55 kDa の 3 つは同一である可能性が高く、LC MS/MS の結果と合わせるとこの 3 つはアルブミンであると考えられた。また、約 25 kDa のタンパク質はオリジナルなものだと考えられたが、同定には至らなかった。

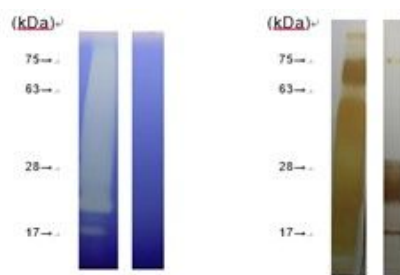


第 7 図 画分 14・15 の Native-PAGE 電気泳動図
各画分につき 3 列泳動した。左から 1, 2 列目は葉 30 g 分、3 列目は葉 750 g 分の濃縮液である。▶で示す画分 14-15 の共通バンド(約 28-37 kDa)をゲル抽



第 8 図 ゲル抽出産物の Native-PAGE 電気泳動図
左: RNA 分解活性染色, 右: 銀染色。

第 7 図で示した活性を有するバンドのゲル抽出産物を泳動した。左から画分 14・15 (葉 30 g 分) およびゲル抽出産物 (4 回くり返し)。



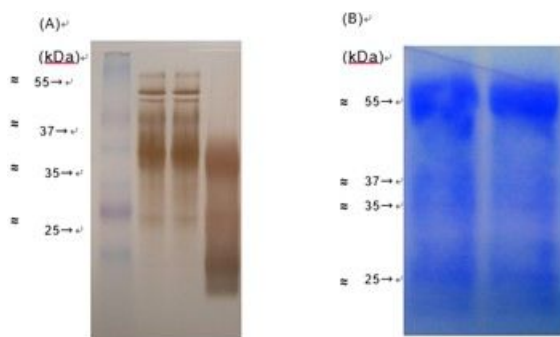
第 9 図 ゲル抽出産物の非還元 SDS-PAGE 電気泳動図
左: RNA 分解活性染色, 右: 銀染色。

それぞれの染色図において左は画分画分 14・15 (葉 30 g 分)、右は第 8 図で約 100 kDa のバンドが認められたゲル抽出産物を泳動した。銀染色において約 18 kDa のバンドが Native-PAGE 電気泳動より新たに認められた。



第 10 図 *Capsicum annuum* thionin-like protein の半定量 RT-PCR 電気泳動図

左から、100 bp マーカー、'Sy-2'、'紫'、CP、'紫'×CP、('紫'×CP) × '紫'5 個体を泳動した。



第 11 図 ゲル抽出産物の Native-PAGE 電気泳動後の(A)銀染色(B)CBB 染色
同時に泳動した 2 枚のゲルを銀染色あるいは CBB 染色にそれぞれ供試した。なお、Native-PAGE での泳動のため、サンプルサイズは推定分子量とした。

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2件)

B. Iraklis, H. Kanda, T. Nabeshima, M. Onda, N. Ota, S. Koeda and M. Hosokawa. 2016. Digestion of chrysanthemum stunt viroid by leaf extracts of *Capsicum chinense* indicates strong RNA-digesting activity. Plant Cell Rep. in press. (査読あり) doi:10.1007/s00299-016-1977-z

T. Nabeshima, M. Doi and M. Hosokawa. 2016. *Agrobacterium*-mediated inoculation of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) plants with chrysanthemum stunt viroid. J. Virol. Meth. in press. (査読あり) doi:10.1016/j.jviromet.2016.05.001

〔学会発表〕(計6件)

細川宗孝・神田紘子・恩田麻由・小枝壮太・鍋島朋之・土井元章. 2014. トウガラシ2種間における葉抽出液のRNase活性の違い. 園学研. 13 別 1: 312.

I.N.ブブラカス・細川宗孝. 2015. ブーゲンビレアの抽出液によるベンサミアナタバコへのPMMoV, PVX, TSWVおよびCSVdの感染回避. 園学研. 14 別 1: 209.

I.N.ブブラカス・細川宗孝. 2015. キクわい化ウイルスの感染抑制剤としてのブーゲンビレアとカプシカムの混合抽出液. 園学研. 14 別 1: 210.

I.N.ブブラカス・恩田麻由・鍋島朋之・細川宗孝. 2015. *Bougainvillea* と *Capsicum* の葉抽出液によるPMMoVの感染抑制メカニズム. 園学研. 14 別 2: 303.

鍋島朋之・土井元章・細川宗孝. 2015. アグロインフィルトレーション法によるキクわい化ウイルスの接種. 園学研. 14 別 2: 244.

鍋島朋之・土井元章・細川宗孝. 2016. キク矮化ウイルス(CSVd)抵抗性のキク品種‘鞠風車’におけるCSVdの接種葉での増殖. 園学研. 15 別 1: 445.

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

細川宗孝 (HOSOKAWA, Munetaka)
京都大学・農学研究科・准教授
研究者番号: 40301246

(2)研究分担者

栗野達也 (AWANO, Tatsuya)
京都大学・農学研究科・助教
研究者番号: 40324660