

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292036

研究課題名(和文)人工DNA結合タンパク質を用いたDNAウイルス耐病性農作物の創出

研究課題名(英文)Generation of plants resistant to DNA viruses using artificial DNA-binding proteins

研究代表者

世良 貴史 (SERA, TAKASHI)

岡山大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：10362443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目標は、標的のDNAウイルスを人工DNA結合タンパク質により不活性化し、農作物へのDNAウイルス感染を防ぐ技術を開発することである。そのためまず、ウイルスを不活性化する人工DNA結合タンパク質をデザインし、その遺伝子を植物に導入し、目的タンパク質を発現する植物を作製した。さらに、作製した植物のDNAウイルスへの耐性を評価するために、植物DNAウイルスの感染系を構築した。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study is to develop plants resistant to DNA viruses by inactivating them with artificial DNA-binding proteins. For this purpose, we designed an artificial DNA-binding protein to inactivate DNA virus of our interest and introduced the gene encoding the protein into plants, resulting in generation of the transgenic plants. Furthermore, we constructed an infection system based on an agroinoculation method to evaluate their virus resistance.

研究分野：蛋白質工学・遺伝子工学・植物工学

キーワード：ウイルス耐病性 植物DNAウイルス

### 1. 研究開始当初の背景

ウイルスは、様々な生物に感染し、被害を与え続けている。植物についても同じで、様々な植物ウイルスが存在し、様々な農作物に被害を与え続けている。さらに、交通手段の発達により、様々なものが国境を越えて移動し、その中に混入しているウイルス（あるいはウイルスベクター）を完全に排除するのは困難であり、現時点でウイルスへの有効な対処法がなく、ウイルスの感染は拡大の一途をたどっている。最近のバイオテクノロジーの進歩により、いくつかのウイルスに抵抗性を示す耐性品種が開発・市販されている。しかしながら、目的の作物の収穫はある程度できるが、ウイルス耐性品種においても一旦感染してしまうと、ウイルス自体は耐性品種内で増殖してしまうため、それ自体が新たな感染源となってしまう。そのため、さらなる感染を防ぐため、厳重な管理が求められる。また、耐性品種によっては、異なる亜型に対しては全く耐性を発揮できない品種も見られ、根本的な解決には至っていない。ウイルスによる経済的な損害は、世界で年6兆円とも言われ、増え続ける世界人口の食糧をどうやってまかなっていくかを考えるうえでも、植物ウイルスによる感染を防ぐ手段の開発は、益々重要となっていくと予想される。

### 2. 研究の目的

本研究の最終目標は、幅広いウイルス種に対応し、ウイルスの増殖を阻害し、植物に耐性ではなく免疫性を付与する技術を開発することである。そこで、本研究では、まずは、標的の DNA ウイルスによる感染を人工 DNA 結合タンパク質を用いて阻害できるかどうかを検証する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 人工 DNA 結合タンパク質およびウイルス複製タンパク質発現ベクターの構築

標的 DNA ウイルスを不活性化する人工 DNA 結合タンパク質を当研究室で確立済みの方でデザインした。作製に必要な各 DNA オリゴマーを合成し、それらをアッセンブルすることで人工 DNA 結合タンパク質遺伝子を作製した。作製した遺伝子を大腸菌用発現ベクターの BamHI/HindIII サイトにクローニングして作製した。

また、ウイルス複製タンパク質は、作製したウイルスゲノム DNA（その作製については項目(4)を参照）を用いて該当する遺伝子領域を PCR で増幅し、大腸菌用発現ベクターの BamHI/HindIII サイトにクローニングして作製した。

#### (2) 人工 DNA 結合タンパク質およびウイルス複製タンパク質の精製

上述の各発現ベクターを大腸菌株 BL21(DE

3)に導入し、1 mM IPTG で 30°C、3 h で目的タンパク質の発現を誘導した。誘導後、超音波破碎し、得られた上清を陽イオン交換カラムにアプライし、NaCl の添加により、各目的タンパク質を溶出し、精製した。

#### (3) 人工 DNA 結合タンパク質遺伝子の植物への導入

項目(1)で作製した人工 DNA 結合タンパク質遺伝子を PCR で増幅し、植物発現用のバイナリベクターの EcoRI/HindIII サイトにクローニングした。次に、当研究室で確立されているプロトコールにしたがって、アグロバクテリアの植物への感染力を利用して、構築した発現系を植物に導入した。すなわち、人工 DNA 結合タンパク質発現ベクターで形質転換されたアグロバクテリアを植物の組織切片に感染させ遺伝子発現系を導入していき、薬剤耐性にもとづいて遺伝子導入体を選抜していきながら、カルス、シュート、続いて、発根を順次誘導していった。さらに、得られた遺伝子導入体を順化し、ポットに移し、遺伝子組み換え植物を作製した。人工 DNA 結合タンパク質遺伝子導入の確認はゲノム PCR により、また人工 DNA 結合タンパク質発現の確認はウエスタンブロットにより確認した。

#### (4) 感染用ウイルスベクターの構築

ウイルス耐性を評価するために、ウイルス感染に必要なウイルスベクターを作製した。標的ウイルスゲノムを複数の領域に分け、各領域をカバーできるように必要な DNA オリゴマーをそれぞれ合成し、それらを用いてアッセンブルすることにより作製し、クローニングベクターにクローニングした。作製中に見られた変異は市販キットを用いて修正した後、それぞれの領域を切り出し連結することにより、ウイルスゲノム DNA を作製した。最終的にバイナリベクターにクローニングし、感染用ウイルスベクターを構築した。

#### (5) アグロバクテリアを用いたウイルス感染

項目(4)で作製した感染用ウイルスベクターでアグロバクテリアを形質転換し、得られたコロニーを培養して、小分けしたグリセロールストックを作製し、-80°C に保存した。

感染実験の前日に、グリセロールストックを適切な抗生物質を含む LB 培地に植菌し、30°C、16~17 h 培養した。集菌後アセトシリンゴンを含む resuspension buffer で懸濁した。植物の葉を爪楊枝で傷をつけた箇所し、得られたアグロバクテリア溶液をシリンジで注入した後、16 h 光照射、室温で植物を育成し、ウイルスの病兆を観察した。

### 4. 研究成果

(1) 人工 DNA 結合タンパク質を発現する植物の作製

本研究目的用にデザイン・作製した人工 DNA 結合タンパク質遺伝子をアグロバクテリアの植物への感染力を利用して、植物に導入した。薬剤耐性を示すカルスから得られたシュートをカルスから切り離し、発根を促す寒天培地で培養することにより、植物個体を再生した。さらに、順化を行うことにより、ポットに移し、遺伝子組換え植物を作製した。作製したそれぞれの個体において、葉から DNA を抽出し、人工 DNA 結合タンパク質遺伝子を増幅するプライマーセットを用いて PCR を行うことにより、目的遺伝子を保持しているかどうかを検証した。一例として、図 1 に示されるように、目的遺伝子を有する植物を作製することができた。また、各遺伝子組換え体の葉の抽出物を用いて、ウェスタンブロットを行った。一例として、図 2 に見られるように、人工 DNA 結合タンパク質に該当するバンドがはっきりと検出された。今後、濃度がわかっている精製タンパク質とのバンド強度の比較により、発現タンパク質量を評価する予定である。

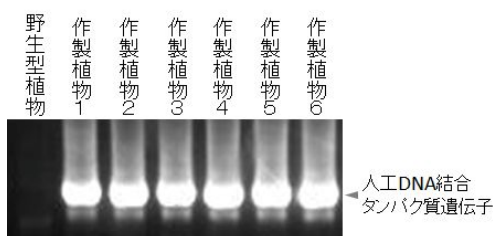


図 1. 作製した植物のゲノム PCR

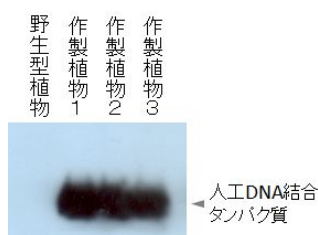


図 2. 作製した植物のウェスタンブロット

## (2) 感染用ウイルスベクターの構築

作製した人工 DNA 結合タンパク質発現植物体のウイルス耐性を評価するために、ウイルス感染系の構築を行った。

まず、標的のウイルスの感染用ベクターの構築を行った。該当するウイルスのゲノム領域を複数の断片に分割し、それぞれの DNA 断片を該当する合成オリゴマーのアニーリング及びクレノーフラグメントのフィル・イン反応により合成した後、オーバーラップを利用した PCR による再構成により作製したウイルスゲノム DNA をバイナリーベクターへクロー

ニングした。クローニング中に見られた PCR による変異は、随時キットを用いて修復していき、最終的に目的ベクターを作製した。

## (3) 野生型植物へのウイルス感染

項目(2)で作製した感染用ウイルスベクターで形質転換したアグロバクテリアを用いて、野生型植物へのウイルス感染を試みた。

作製したアグロバクテリアを液体培地で培養し、集菌後 resuspension buffer で懸濁した溶液を、植物の葉を爪楊枝で傷つけた箇所にシリンジで注入し、ウイルスの病兆を継続的に観察した。しかしながら、以前似たウイルスで見られた条件で何度行っても、感染の効率が非常に低く（接種した数個体中、病兆を示す個体が全くない場合あり）かつその結果が実験ごとに異なり、以前のように安定した結果が得られなかった。そこで、我々の感染条件下では、用いた亜型ウイルスの感染能力が非常に低いことが考えられた。

## (4) 感染用ウイルスベクターの再構築

項目(3)で述べたように作製したウイルスベクターの感染力が安定せず、感染効率が従来に比べ極端に低かったため、このままではより多くの植物体へのウイルス接種が必要となり、かつ作製した人工 DNA 結合タンパク質の性能を正しく評価することが困難になってしまう。そこで、さらなるウイルス接種条件の検討よりも、別の亜型のウイルスの感染系の構築を目指すこととした。

実験項で述べたように、目的ウイルスゲノムを合成 DNA オリゴマーを組み合わせることでより作製した。各領域の DNA フラグメントの作製にてこずり、数回アッセムブルの方法を変えて試すことにより、最終的に目的のウイルスベクターを 1 クローン作製することができた（図 3）。

作製したベクターをアグロバクテリアに導入後培養し、ミニプレップによりベクター DNA の抽出・精製を行った。得られたベクターを制限酵素切断によりマッピングしたところ、図 4 に見られるように、作製したバイナリーベクターがアグロバクテリア内で安定に保持されることを確認した。

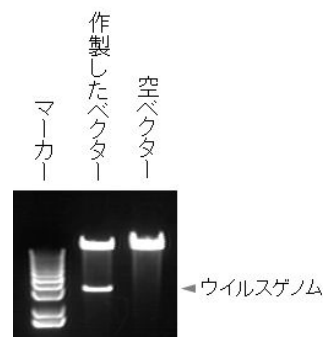


図 3. 作製したベクターのインサートチェック

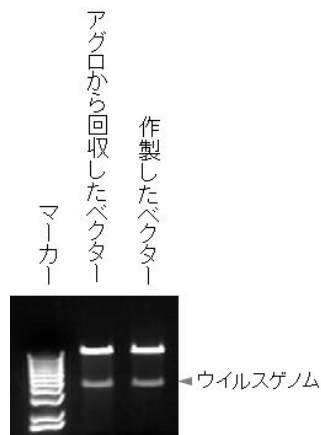


図4. 作製したベクターの安定性の確認

構築したウイルス感染用バイナリベクターを用いて、現在野生型植物への感染の能力を検証中である。もし、以前見られた感染条件でも再度感染が見られなかった場合、ウイルス接種場所や接種する植物の成長ステージ、さらにウイルス接種後より高温・多湿条件下での植物体の培養条件を検討する予定である。

以前のように、野生型植物へのウイルス接種により病兆が安定して観察されるようになれば、作製した人工DNA結合タンパク質を発現する植物にウイルス接種し病兆を野生型植物と比較することにより、人工DNA結合タンパク質によるウイルス感染阻害能を評価する予定である。と同時に、新たに作製したウイルスベクターを用いたウイルス接種により、ウイルス感染が野生型で安定的に観察された場合、この亜型のウイルス複製タンパク質等の大腸菌発現ベクターの構築及びタンパク質精製をやり直し、試験管内でも人工DNA結合タンパク質によりウイルス複製タンパク質の機能を効果的に阻害できるかどうかも並行して行う予定である。すなわち、人工DNA結合タンパク質によるウイルス不活性化能を *in vitro* および *in vivo* の両方で検証していく予定である。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

世良 貴史 (SERA, Takashi)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：10362443

##### (2) 研究分担者

該当者なし

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

該当者なし